GE Healthcare

Biacore

Biacore 3000

Ver.4.0

Instrument Handbook

日本語取扱説明書

（ウィザード対応版）

GE imagination at work

71-3129-32

目　次

1. セットアップ 1

1-1. 電源およびソフトウェアの起動 1

1-1-1. 電源の立ち上げおよびランニング緩衝液の準備 1

1-1-2. コントロールソフトウェアの起動 2

1-2. システムの初期化 3

1-2-1. センサーチップの挿入 3

1-2-2. ランニング緩衝液の置換 5

1-2-3. ラックの設定 7

1-2-4. 温度設定 9

1-2-5. SPR シグナルの校正 10

2. 基本操作（マニュアル測定） 11

2-1. マニュアル測定の実行方法 11

2-1-1. 試料の添加 11

2-1-2. レポートポイントの記録 14

2-1-3. ファイルの保存 15

2-2. データの印刷 16

2-3. 緊急停止 16

3. 固定化 17

3-1. アミンカップリング法 19

3-1-1. リガンド希釈液の pH 選択 21

3-1-2. 標準プロトコールでの固定化 27

3-1-3. 固定化量を調節して固定化 33

4. 相互作用測定の条件検討 37

4-1. マニュアル操作による相互作用の条件検討 40

4-2. ウィザードによる相互作用の条件検討 47

4-2. リガンドの安定性試験 52

4-3. 反応速度定数算出のための実験系の評価 56

4-3-1. 固定化量の評価 56

4-3-2. 結合様式の評価 60

5. 相互作用測定 64

5-1. 反応速度定数・解離定数の算出 64
5-2. 特異的結合確認 69
5-3. スクリーニング 74
5-3-1. 基本プログラム 76
5-3-2. 再生の自動判断機能を利用したプログラム 85
5-4. 濃度測定 89

6. シャットダウン 94

6-1. 実験の終了 94
6-2. センサーチップの取り出し 95
6-3. センサーチップの保存 95

7. メンテナンス 96

7-1. システムの洗浄 96
7-2. エアーが混入したときの対処法 97
7-3. 流路系に詰まりがあるときの対処法 98
7-4. システムチェック 98

8. データ管理 101

9. Surface Prep ユニット 103

9-1. Surface Prep ユニットの特性 103
9-2. Surface Prep ユニットの概要 104
9-3. セットアップ 106
9-3-1. システム本体の準備 106
9-3-2. Surface Prep ユニットの準備 106
9-3-3. Surface Prep ユニットへのセンサーチップのドッキング 108
9-3-4. Surface Prep ユニットのシステムへの装着 108
9-4. リガンドの固定化 109
9-5. 結合アナライトの回収 113
9-5-1. マイクロ流路系を用いた回収条件の確認 115
9-5-2. Surface Prep ユニットを用いた回収 120
9-6. Surface Prep ユニットの洗浄 124

索引 125

1. セットアップ

1-1. 電源およびソフトウェアの起動

1-1-1. 電源の立ち上げおよびランニング緩衝液の準備

定電圧電源装置 → テーブルタップの電源 → プリンター → モニター画面 → システム本体 → コンピュータ の順番に電源を入れる。
Windows のバージョンにより、パスワード(biacore)の入力が必要な場合がある。

↓

本体のフロントパネル上の左にあるインジケータ（ライト）が点灯し、30 秒程でリセット後、新たに必要事項のみが点灯あるいは点滅する。

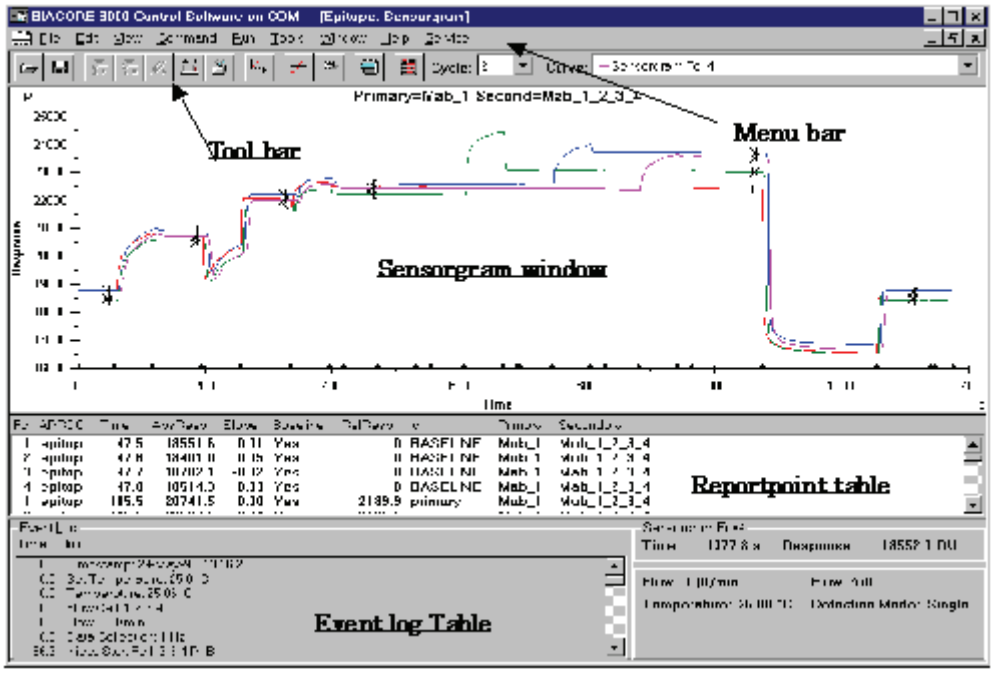
↓

Biacore 本体のドアを開け、本体右側下部の細い 2 本のインレットチューブをランニング緩衝液のボトルに、太いシリコンチューブを廃液入れの空ボトルに入れる。

補足 1. 装置の配置

1-1-2. コントロールソフトウェアの起動

モニターの初期画面中の左下のスタートを押し、**BIA programs** をクリックし、**BIACORE 3000 Control Software** のアイコン（ BIACORE 3000 Control Software ）をクリックする。



補足 2. 画面の説明

Menu bar

Biacore のすべての操作コマンドが含まれている。

Toolbar

使用頻度の高いコマンドをアイコン化しており、簡便にコマンド操作を選択できる。

Sensorgram window

センサーグラムをリアルタイムに表示。

Report point table

指定した時間におけるレスポンスを数字で表示。結合量の表示等に使用。

Eventlog window

測定中の操作内容を表示。グラフの X 軸上の（▲）と対応。

Status window

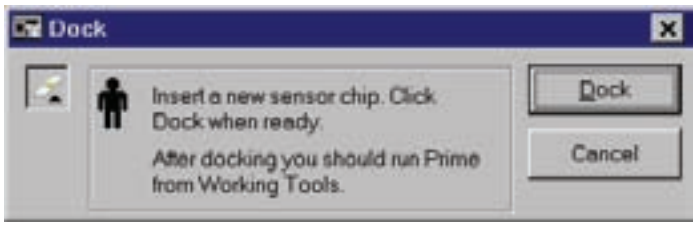
現在のシステムの状態を表示。

時間、レスポンス（RU）、流速、使用フローセル、温度、Run 実行状態

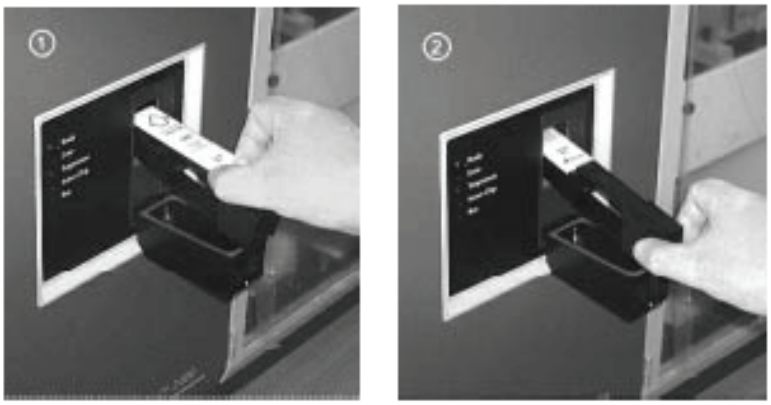
1-2. システムの初期化

1-2-1. センサーチップの挿入

ソフトウェアを立ち上げると **Dock** ボックスが自動的に表示される。



↓



黒のカバーを開け、コンベアを手前に引く。コンベアによって引かれてきたガイドピンにセンサーチップシートのホールが組み合わさるようにセンサーチップをセットし、コンベアを押し込み、カバーを戻す。
（フロントパネルのインジケータの Sensor chip のシグナルが緑色に点滅する）

↓

Dock ボックスの **Dock** をクリックする。
（フロントパネルのインジケータの Sensor chip のシグナルが緑色の点灯に変わる）

補足 3. Dock 時の注意事項・解説

① センサーチップ内のプラスチックシートがセンサーチップのカバーにしっかり収まっていることを確認してから挿入する。
② センサーチップを冷蔵庫から取り出した場合には、室温に戻したあと、包装あるいは容器から取り出すようにする。
③ センサーチップの交換は必ず Undock の状態でおこなう。インジケータの Sensor chip が Dock 状態（本体シグナルが緑色の点灯時）に、強引にセンサーチップを抜かないようにする。

補足 4. センサーチップの種類

詳細は、センサーチップガイドのカタログまたはホームページを参照する。

(1) **Sensor chip CM5**

カルボキシメチルデキストランをコーティングしたチップ。アミンカップリング、チオールカップリング、アルデヒドカップリング等の固定化に利用する汎用性の高いチップ。

Research Grade	ロット間の固定化量の誤差が 15%以下のチップ。通常の実験に使用できる。
Certified Grade	ロット間の固定化量の誤差が 5%以下のチップ。品質管理等で長期にわたる精密な実験を組む場合等に使用する。

(2) **Sensor chip CM4**

Sensor chip CM5 のカルボキシメチルデキストランの導入量を減少させたチップ。カルボキシル基にイオン交換的に非特異的結合する塩基性物質を含むサンプルを用いる場合に使用する。

(3) **Sensor chip CM3**

Sensor chip CM5 のカルボキシメチルデキストランを短くしたチップ。巨大分子（細胞、細菌、ファージ等）の固定化や、添加して相互作用測定をおこなう場合に利用する。

(4) **Sensor chip C1**

金表面に直接カルボキシル基のみを導入したチップ。Sensor chip CM3 と同様に、巨大分子（細胞、細菌、ファージ等）を用いる場合に使用する。比較的非特異的結合が多い。

(5) **Sensor chip SA**

ストレプトアビジンをあらかじめ固定化してあるカルボキシメチルデキストランベースのチップ。ビオチン化した DNA、ペプチド、化合物等ビオチン化分子の固定化に使用する。

(6) **Sensor chip NTA**

NTA をあらかじめ固定化してあるカルボキシメチルデキストランベースのチップ。ヒスチジンタグを持つ発現タンパク質（His-Tag Fusion Protein）を Ni^{2+}を介して固定化できる。

(7) **Sensor chip HPA**

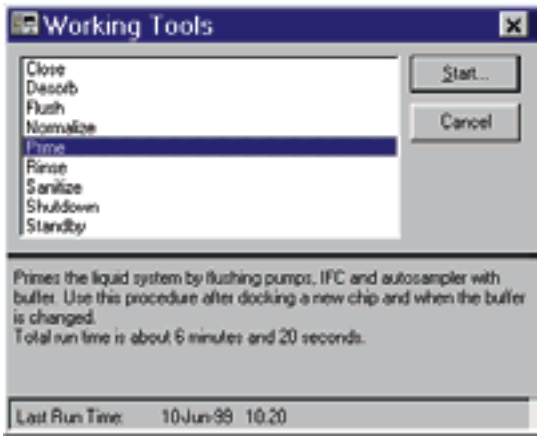
金表面にオクタデシル基（C18）を導入したチップ。疎水性の高い表面で、リン脂質や糖脂質などをリポソームとして添加することで、単層（monolayer）で固定化できる。

(8) **Sensor chip L1**

疎水性分子をあらかじめ固定化してあるカルボキシメチルデキストランベースのチップ。リン脂質や糖脂質などをリポソームとして添加することで、二重膜（bilayer）で固定化できる。糖脂質、リン脂質や膜貫通型レセプター等の固定化に使用できる。

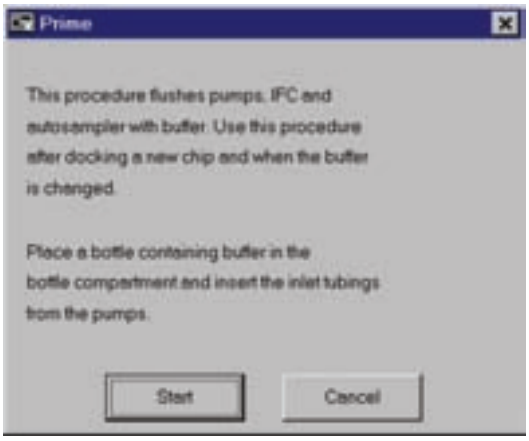
1-2-2. ランニング緩衝液の置換

Dock 操作終了後、自動的に **Working Tools** の **Prime** が選択される。



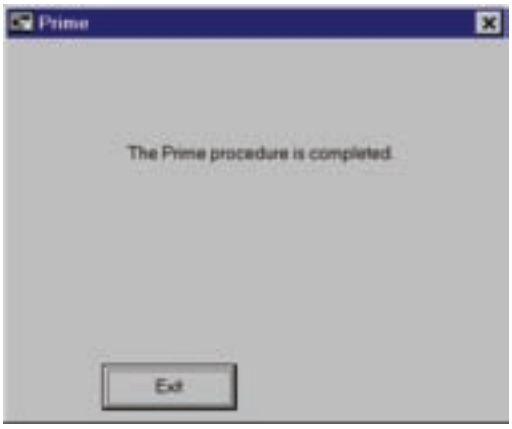
ランニング緩衝液および廃液入れを確認後、**Start...**をクリックする。

↓


Prime
This procedure flushes pumps, IFC and autosampler with buffer. Use this procedure after docking a new chip and when the buffer is changed.
Place a bottle containing buffer in the bottle compartment and insert the inlet tubings from the pumps.
Start
Cancel

内容を確認後、**Start** をクリックする。

↓



Prime 終了後、**Exit** をクリックする。

補足 5. Prime における注意事項・解説

① **Prime** は、**Tools → Working Tools** から開くことができる。
新しくセンサーチップを挿入したときやランニング緩衝液を交換するときにおこない、ポンプやマイクロ流路系、オートサンプラー等をランニング緩衝液で洗浄、置換する操作である。

② 実験目的にあわせ、緩衝液の変更は自由であるが、各自で調製する場合には、0.22 um フィルターでろ過をおこない、さらに十分脱気をおこなう。また、センサーチップ CM5 使用の場合は、リガンドの固定化終了時まで、アミン系の緩衝液(トリスあるいはグリシン緩衝液等)は使用しない。10X バッファーから界面活性剤入りのランニング緩衝液を調製する場合は、脱気後に界面活性剤を添加する。

ランニング緩衝液として、弊社から HBS 緩衝液および PBS 緩衝液を販売している。

HBS-EP

10 mM HEPES / 0.15 M NaCl/3 mM EDTA / 0.005 % Surfactant P 20（pH7.4）
フィルターろ過、脱気済み

HBS-P

10 mM HEPES / 0.15 M NaCl/0.005 % Surfactant P 20（pH7.4）
フィルターろ過、脱気済み

HBS-N

10 mM HEPES / 0.15 M NaCl（pH7.4）
フィルターろ過、脱気済み

HBS-N 10X

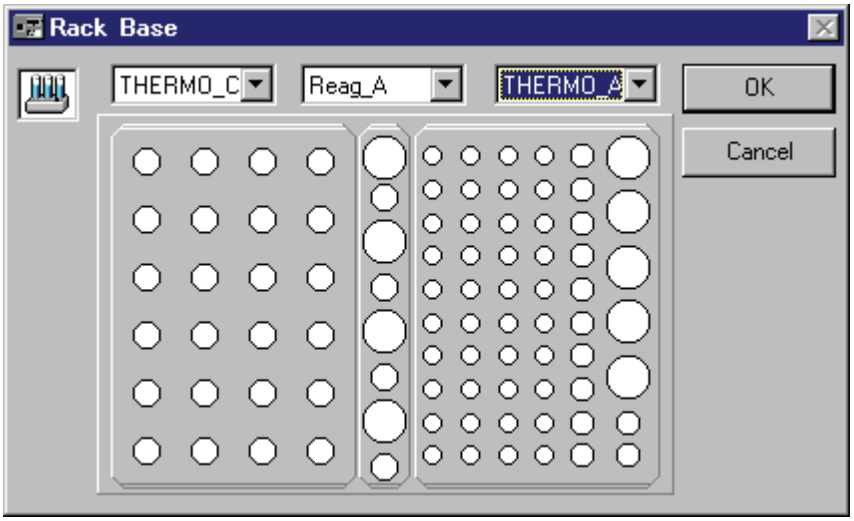
0.1M HEPES / 1.5 M NaCl（pH7.4）
⇒超純水で 10 倍希釈
10 mM HEPES / 0.15 M NaCl（pH7.4）
フィルターろ過済み、**脱気必要**

PBS 10X

0.1M phosphate buffer / 27 mM KCl /1.37 M NaCl
⇒超純水で 10 倍希釈
10 mM phosphate buffer / 2.7 mM KCl /137 mM NaCl
（5%DMSO 混合条件で pH7.4）
フィルターろ過済み、**脱気必要**

1-2-3. ラックの設定

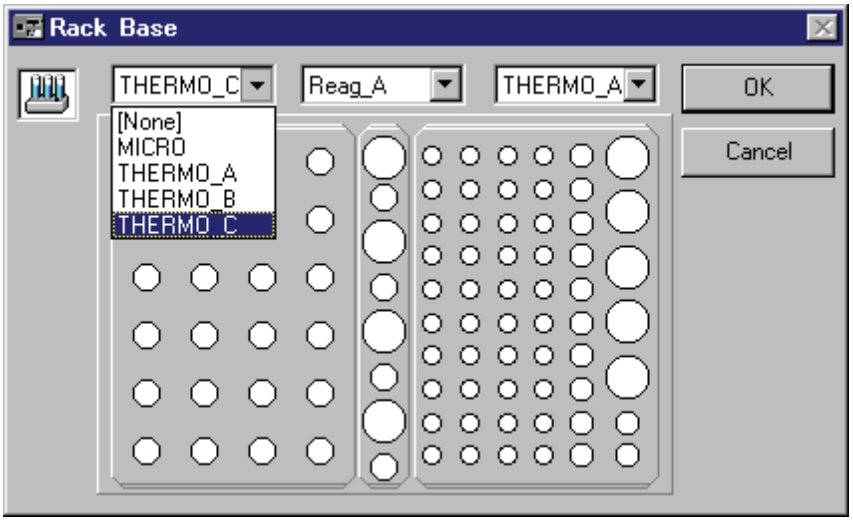
使用するラックの設定をおこなう。
Command → Rack **B**ase...をクリックする。



↓

ラックに変更がある場合には、▼をクリックし選択する。

↓



OK をクリックする。

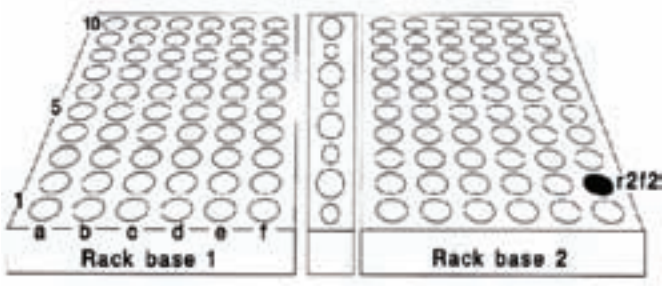
各ラックと使用できるバイアルについては、補足 6 を参照。

補足 6.ラックの設定における注意事項・解説

ラックベースは向かって左側が Rack Base1、右側が Rack Base2 となる。
各ラックには次のバイアルがセットできる。
バイアルを使用する際には、**専用のラバーキャップを必ず使用する。**パラフィルムなどニードルの穴をふさぐ可能性のあるシールは使用しない。

ラバーキャップ、タイプ 4		ラバーキャップ		
プラスチック バイアル 7 mm	ガラス バイアル 9 mm	プラスチック バイアル 1.5 ml	プラスチック バイアル 2 ml	ガラス バイアル 16 mm
• Thermo_A A〜D 列	• Thermo_A E 列、F1,F2 • Thermo_B	• Thermo_C • Reag_A R2,4,6,8	• Thermo_C • Reag_A R2,4,6,8	• Thermo_A F3〜F7

ラックのサンプルの位置は以下のように指定される。



ラックベースは向かって左側が Rack Base1、右側が Rack Base2 となる。たとえば、左側のラックの “a” の列の手前の 1 番目から 3 番目のサンプルは、それぞれ R1A1、R1A2、R1A3 となる。マイクロタイタープレート（96 穴）の場合にも同様な方法で設定する。
なお、Reag_A での位置の設定は、手前から RR1, RR2, RR3... である。

マイクロチューブを使用する場合の注意事項

① チューブの底がラックの穴の底に届くものを使用する。
② ニードルはラックの穴の中央に下りる。チューブのエッジがぶつからないものを使用する。
③ 蓋付のチューブは、蓋を切り取る。ニードルは蓋を貫通しない。

1-2-4. 温度設定

フローセルを含む検出器部位の温度の設定をおこなう。
Command → **Set Temperature...**をクリックする。

↓

4～40℃の範囲で設定し、**OK** をクリックする。

補足 7. 温度設定における注意事項・解説

① 温度設定は 4～40℃で設定できる。

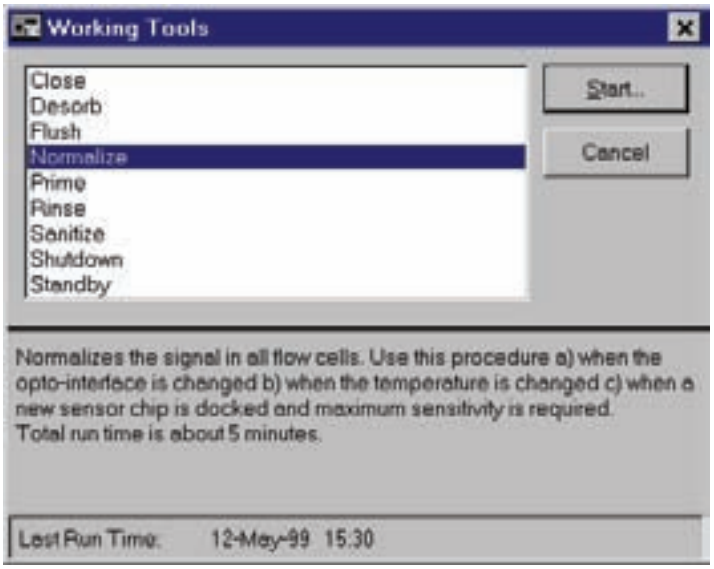
② 設定温度に達していない場合、画面上のステータスウインドウ中の温度の表示が赤の点滅、本体インジケータの Temperature のシグナルが橙色の点滅をする。
設定温度に達し温度が安定した場合には、画面上の温度の表示が黒、インジケータは点灯に変わる。

③温度が安定するまでに比較的時間がかかるので、室温から離れている場合は、早めに設定する。5℃温度変更する場合、約 1 時間を要する。

④サンプルラックの温度を調整する場合は、恒温循環槽のチューブを本体右側面のノズルに接続する。このとき、専用のアダプターを使用する。

1-2-5. SPR シグナルの校正

Thermo_A をラック 2（右側）にセットする。
BIAmaintenance kit 中の **BIAnormalizing solution 0.5 ml** を 9 mm のガラスバイアルに移し、**R2F2** にセットして、**Tools** → **Working Tools...** → **Normalize** をクリックする。



溶液をセット後、**Start...**を実行する。

補足 8. Normalize における注意事項・解説

この操作は、SPR シグナルの校正をおこなうものである。
以下の場合に実行する。

① 設定温度を変更した場合。
② 最大感度を得たい場合。

温度が安定してからおこなう。

2. 基本操作（マニュアル測定）

基本的な測定モードには、以下の 2 つの方法がある。

マニュアル測定

画面上のアイコンを使い、測定をおこないながら操作するマニュアルモード。簡単な試験など、数回の添加で完了する試験をおこなう場合に有効。

ウィザード測定

ガイダンスに従いながら、実験条件を入力して実行させるオートモード。リガンド分子の固定化や相互作用解析などの実験ごとの専用ウィザードや実験条件の検討を目的としたウィザードなど汎用性の高い実験項目について対応している。ウィザードの操作方法は、3 章、4 章および 5 章を参照。

2-1. マニュアル測定の実行方法

試料として Sucrose 溶液を使用し説明する。

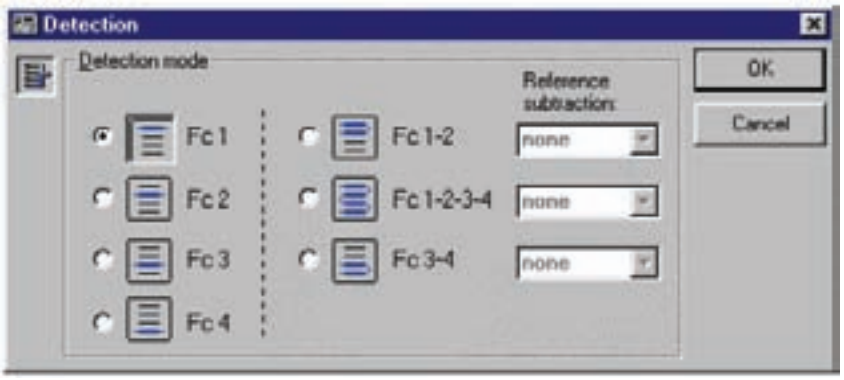
2% Sucrose　4% Sucrose　8% Sucrose　16% Sucrose

2-1-1. 試料の添加

試料（100 µl）をラックにセットする。

アイコン（ ）あるいは **Run** → **Run sensorgram...**をクリックし、センサーグラムをスタートする。

↓

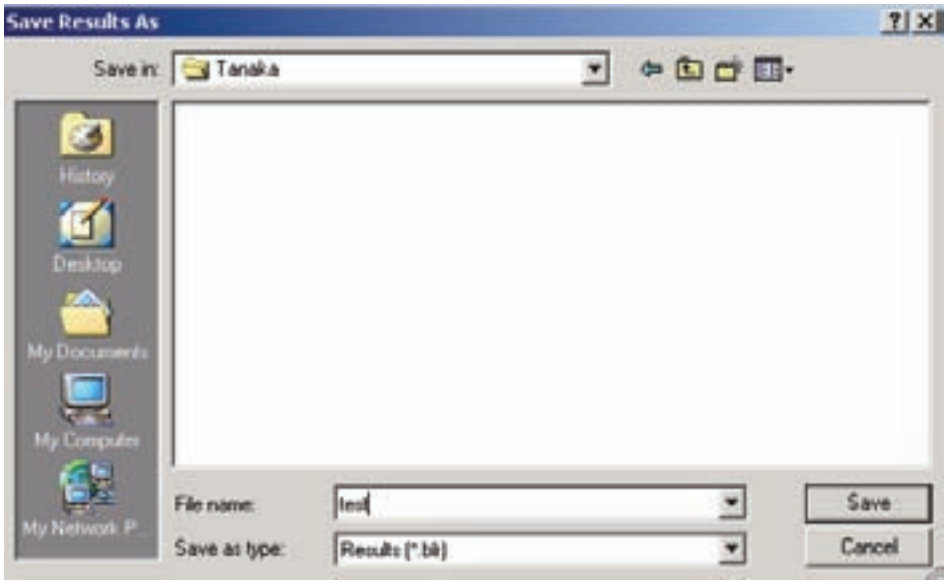


Detection mode を選択し、**OK** をクリックする。

↓

流速（1～100 µl/min）を入力後、**OK** をクリックする。

↓



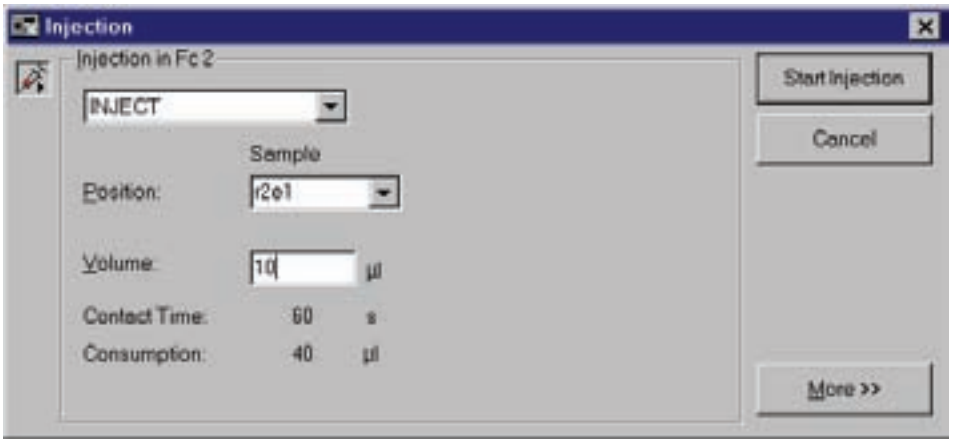
C：＼Bia Users＼（自分のフォルダ）に移動後、ファイル名を入力し、**Save** をクリックする。

↓

センサーグラムが表示され測定が開始される。

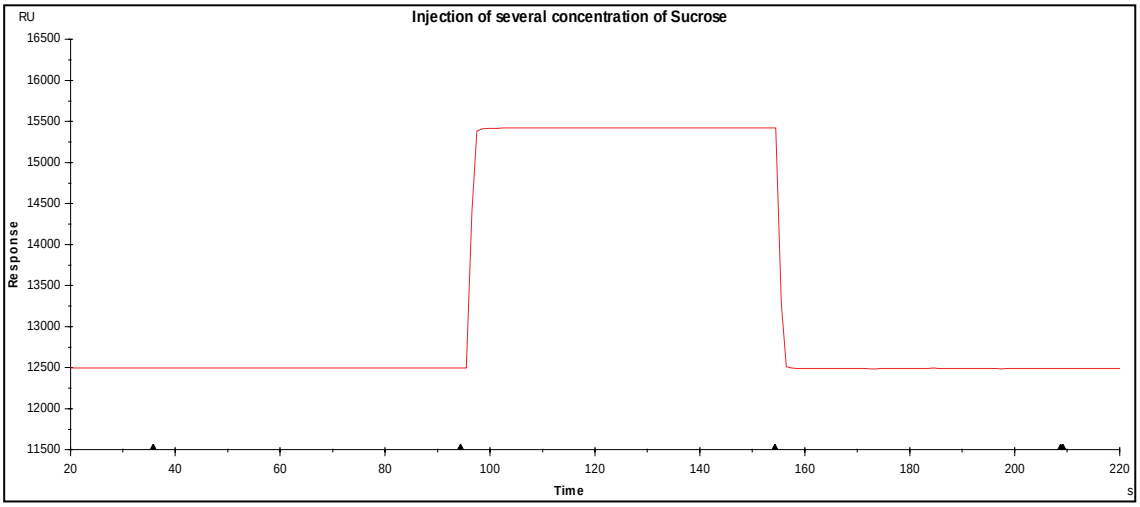
↓

アイコン（ ）あるいは **Command → Inject...**をクリックする。



サンプルの位置および容量（10 µl 程度）を入力し、**Start Injection** をクリックする。

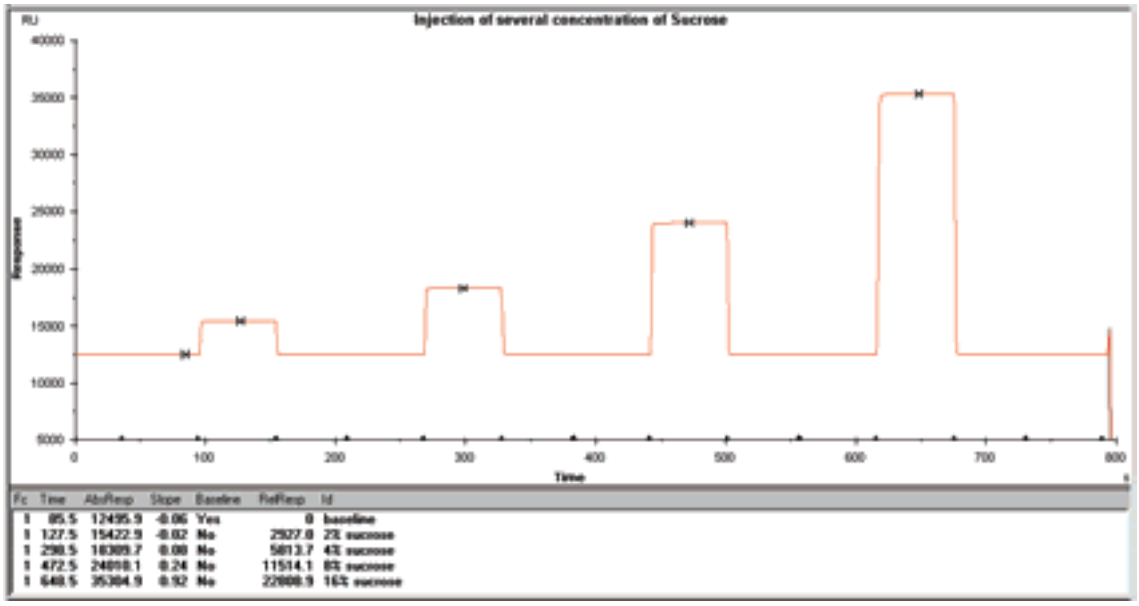
↓



↓

引き続き次の試料を添加する。

↓

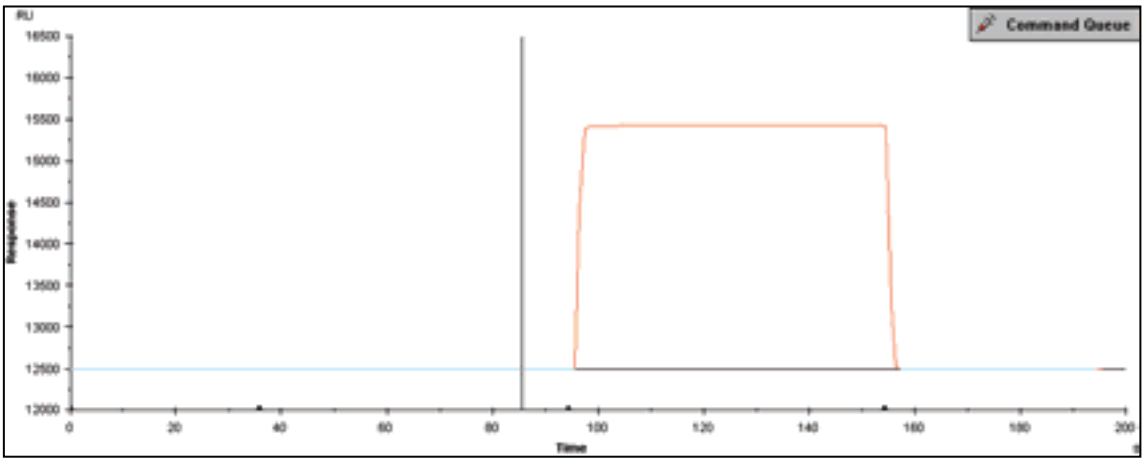


↓

すべてのサンプルの添加が終了したら、アイコン（ ）もしくは **Run** → **Stop Sensorgram** をクリックし、測定を終了する。

2-1-2. レポートポイントの記録

センサーグラム上の任意の時間におけるレスポンス（RU）を下のレポートポイントテーブルに表示させることができる。



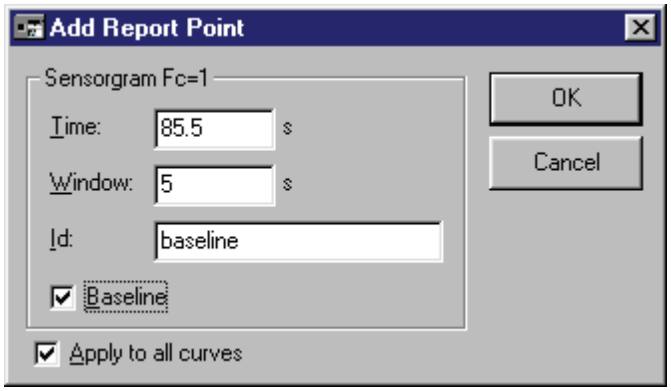
アイコン（ ）あるいは **View** → **Reference Line** をクリックし、センサーグラム上にリファレンスラインを表示させる。

↓

マウスのカーソル（矢印）をリファレンスラインの縦線上に移動後、マウスの左ボタンをドラックし、レポートポイントを取りたい時間に移動するか、もしくはレポートポイントを取りたい場所のセンサーグラム上の位置でカーソルをクリックし、リファレンスラインを移動する。

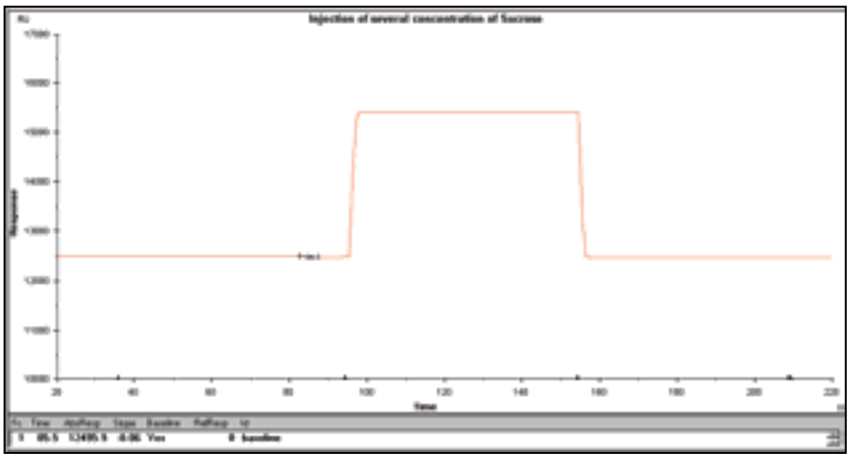
↓

アイコン（ ）あるいは **Edit** → **Add Report Point** をクリックする。



Id:の欄にコメントを入力する。そのときのレスポンスをベースライン（基準値 0 RU）とする場合には、**Baseline** のチェックボックスをチェックすると、レポートポイントテーブル中の相対値（RelResp）の値が 0 になる。

↓

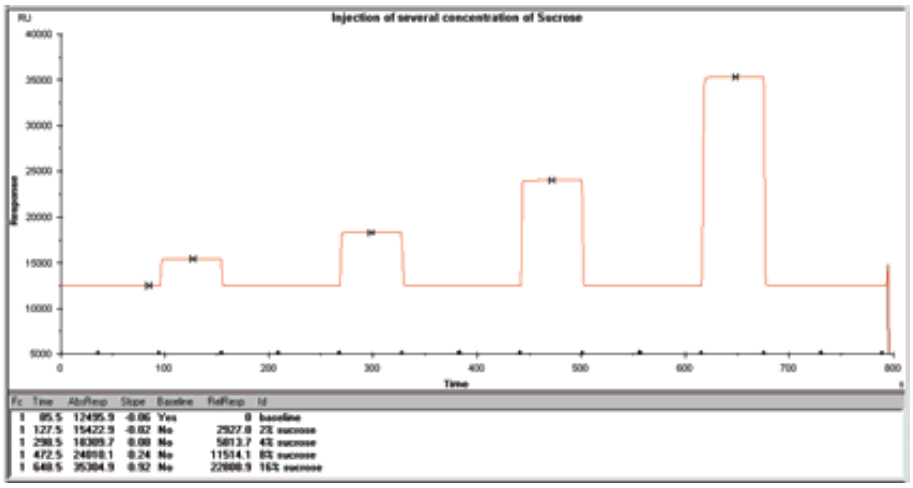


↓

リファレンスラインを次のポイントに移動後、同様にレポートポイントをとると、ベースラインからの相対値（RelResp）が表示される。

さらに必要な場所のレポートポイントを作成する。

↓



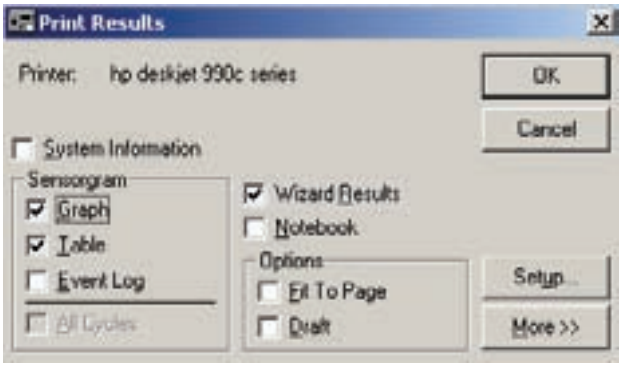
2-1-3. ファイルの保存

得られたセンサーグラムを保存するには、**File** → **Save** もしくは **File** → **Save As** を実行する。

初期設定では **Tools** → **Preferences...**の **Manual Run** タブの画面で Automatic Save の機能が有効になっており、マニュアル操作時には設定された時間ごとに（デフォルトでは 15 分）保存操作が自動的に実行される。

2-2. データの印刷

得られたセンサーグラムを印刷するには、**File → Print...**を選択する。



Graph	センサーグラム
Table	レポートポイントテーブル
Event Log	イベントログ
All Cycles	複数のセンサーグラムが存在する場合、全センサーグラムの印刷が可能。
Fit to Page	1 ページごとに結果を印刷することができる。
Draft	データポイントを減らして印刷することができる。

＊ウィザードの結果を印刷する場合は、Wizard Results にチェックを入れる。マニュアル操作では、この項目は表示されない。

必要事項にチェックを入れ、**OK** をクリックすると、印刷が実行される。

2-3. 緊急停止

測定を緊急停止したい場合は、キーボードの

Ctrl（左下）＋ Break（右上）

を同時に押し、緊急停止する。その時点で、マニュアル操作が終了する。

3. 固定化

リガンド

相互作用を検討する分子のうち、固定化する分子を**リガンド**という。リガンドの精製度は、結合特異性の判定やアナライトの結合許容量に大きく作用する。90%以上の精製度のリガンドを使用する。

各種固定化方法

センサーチップ CM5 に化学結合で固定化する代表的な方法を記載する。詳細およびその他の固定化方法については、"Biacore 実験の手引き"を参照。

アミンカップリング法

リガンド表面に存在するアミノ基（N 末端アミノ基またはリジン ε-アミノ基）を利用して固定化する方法。CM（カルボキメチル）デキストランのカルボキシル基を NHS（N-ヒドロキシスクシンイミド）で活性化し、リガンドを固定化する。固定化後、残った活性 NHS 基をエタノールアミンでブロッキングする。

リガンドチオールカップリング法

リガンドの表面に存在する遊離型チオール基を用いて-S-S-結合で固定化する方法。

サーフェスチオールカップリング法

センサー表面にチオール基を導入し、リガンドのカルボキシル基を介して-S-S-結合で固定化する方法。

アルデヒドカップリング法

大量の糖鎖を持つムチンタンパク質等の糖を利用して固定化をする方法。糖鎖の非還元末端をメタ過ヨウ素酸により開裂させアルデヒド基を作成して、ヒドラジンによりヒドラジノ基を導入したセンサーチップにシッフ塩基で固定化する。

固定化量

実験の目的によって調節する必要がある。

特異的結合の有無の判定、スクリーニング

アナライトの結合レスポンスが十分得られる固定化量が必要となる。固定化量の下限として、理論的最大結合量 Rmax（固定化したリガンドにアナライトが最大量結合したときのレスポンス）が、最低でも **50RU** は必要である。理論的な最大結合量は、以下の式で算出することができる。

アナライトの最大結合レスポンス（理論的最大結合量 Rmax）
=アナライトの分子量 x リガンドの固定化量 /リガンドの分子量 x S
（Da）　（RU）　（Da）
S はリガンドの結合部位数

（例）

リガンドの分子量	50,000 Da
リガンド固定化量	1,000 RU
リガンド結合部位数	1
アナライト分子量	20,000 Da
理論的最大結合量（Rmax）=	20,000 x 1,000 / 50,000 x 1 = 400 RU

濃度測定

固定化量はできるだけ多くする。目安として、タンパク質リガンドの場合、10,000RU 以上固定化する。固定化量を多くすると既知濃度アナライト測定時に得られる結合レスポンス RU vs C（濃度）をプロットした検量線の直線性が高くなる。

反応速度定数（k_a、k_d）、解離定数（K_D）の算出

固定化量はできるだけ抑える。マストランスポートリミテーション（固定化量が多いことにより、アナライトの供給が追いつかない現象）を抑制するためである。至適固定化量は、以下の式から算出される最大と最小の固定化量（RU）の範囲となる。

最小固定化量（RU）
200 x 1/S x （リガンドの分子量／アナライトの分子量）

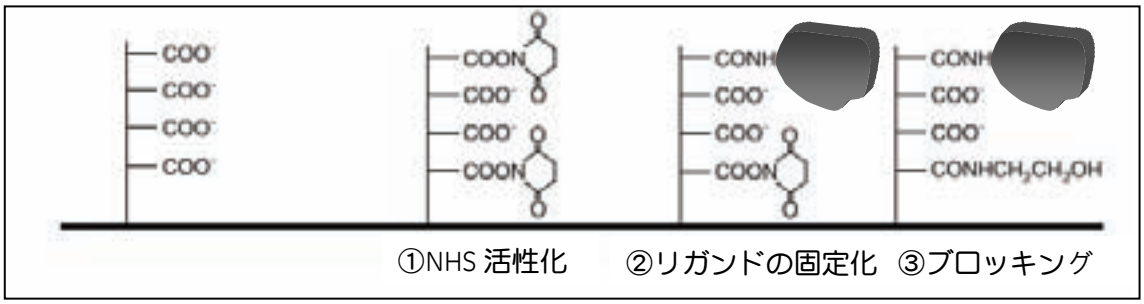
最大固定化量（RU）
1000 x 1/S x (リガンドの分子量／アナライトの分子量)
S はリガンドの結合部位数

（例）

リガンドの分子量	50 kDa
アナライトの分子量	100 kDa
リガンド結合部位数	1
最小固定化量	200 x 1/1 x（50,000/100,000）＝ 100 RU
最大固定化量	1000 x 1/1 x (50,000/100,000）＝ 500 RU
至適固定化量範囲	100～500RU

3-1. アミンカップリング法

リガンド表面に存在するアミノ基（N 末端アミノ基またはリジン ε-アミノ基）を利用して固定化する。CM デキストランのカルボキシル基を NHS（N-ヒドロキシスクシンイミド）で活性化し、至適な緩衝液で希釈したリガンドを固定化する。残った活性 NHS 基をエタノールアミンでブロッキングする。



①NHS 活性化　②リガンドの固定化　③ブロッキング

準備するもの

アミンカップリングキット（BR-1000-50）

アミンカップリングキットには、以下の試薬が含まれている。

EDC (N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride)

NHS (N-hydroxysuccinimide)

1 M Ethanolamine hydrochloride 溶液 (pH 8.5)

キットに添付されている説明書に従い、EDC および NHS はそれぞれ 10 ml の超純水に溶解する。直ちに 200 µl ずつを 7 mm プラスチックバイアルにそれぞれ分注し、ラバーキャップをして使用直前まで-20℃で冷凍保存する。使用直前に 1 組ずつの試薬を取り出して、融解させて使用する。融解後、試薬の再凍結はできない。エタノールアミンは、溶液で供給されるので冷蔵（4℃）保存する。200 µl ずつ小分けしておくか、使用する直前に分注する。

ランニング緩衝液

1 級アミンを含まない緩衝液。（トリスやグリシン緩衝液は避ける。）

リガンド

アジ化ナトリウム等の求核性物質を含まないもの。リガンドの安定化目的のために混入されている BSA（ウシ血清アルブミン）等のタンパク質類はあらかじめ除去する。

リガンド希釈液

10 mM 酢酸緩衝液もしくは、10 mM Borate/1 M NaCl 緩衝液（pH 8.5）

リガンドの調製

リガンドがタンパク質の場合

濃度は 5～200 µg/ml 程度になるよう 10 mM 酢酸緩衝液で希釈する。酢酸緩衝液の pH はリガンドの等電点より 0.5～2 低い pH を使用する。希釈用緩衝液として pH 3.5 以下のものは使用しない。

等電点が不明な場合は、固定化前に、あらかじめ、ウィザードの Immobilization pH Scouting により至適な 10 mM 酢酸緩衝液の pH を検討する。

濃縮効果が確認できない酸性タンパク質の場合は、サーフェスチオールカップリングもしくはリガンドをビオチン化後、センサーチップ SA に固定化する方法を検討する。

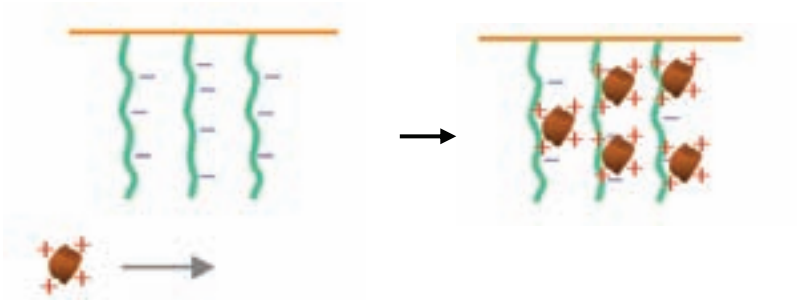
リガンドがペプチドや低分子物質の場合

100 µg/ml 以上の高濃度のリガンドを使用し、弱アルカリ性条件 10 mM Borate/1 M NaCl 緩衝液（pH 8.5）で希釈する。活性型 NHS 基とアミノ基との反応効率は、pH 8.5 前後がもっとも高い。

溶解性が低い低分子化合物を固定化する際には、DMSO などの有機溶媒存在下で固定化を実施する。有機溶媒を利用する際には、化学耐性を英語版マニュアル（Instrument handbook）で確認する。

3-1-1. リガンド希釈液の pH 選択

センサーチップ CM5 表面にコーティングされている直鎖デキストランにはカルボキシル基が導入されているため、表面は負に荷電している。リガンドを正に荷電した状態で添加すると、負に荷電している CM デキストランとの間に静電気的な結合が生じ、リガンドを CM デキストラン中に濃縮することができる。この条件を用いることで低濃度のリガンドをセンサーチップ表面に高濃度で供給でき、効率よく固定化できる。



等電点が既知のリガンドの場合

等電点よりも 0.5 以上低い pH を使用する。ただし、等電点が既知の場合であっても、高次構造の状態などにより、濃縮される pH が予想外に異なることもあるため、固定化前に、ウィザードの **Immobilization pH Scouting** により確認することをお奨めする。

等電点が不明な場合

ウィザードの **Immobilization pH Scouting** を実行し、希釈液の pH を検討する。この操作は、何も処理していないフローセル（固定化実施予定のセル）を使用して、各 pH におけるセンサー表面へのリガンドの濃縮度合いを評価する。この検討で、リガンドは固定化されない。検討後、引き続き、そのセルに固定化をおこなう。

リガンドは終濃度 5～200 µg/ml 程度になるよう 10 mM 酢酸緩衝液で希釈する。**Immobilization pH Scouting** では、リガンド添加終了後、ランニング緩衝液に置換されると、通常は静電的に結合したリガンドはセンサーチップ表面から速やかに解離する。しかし、稀に、リガンドがデキストランに非特異的吸着を起こすため、リガンド添加終了後、洗浄溶液（50 mM NaOH）を添加し、吸着したリガンドの洗浄をおこなう操作が組み込まれている。

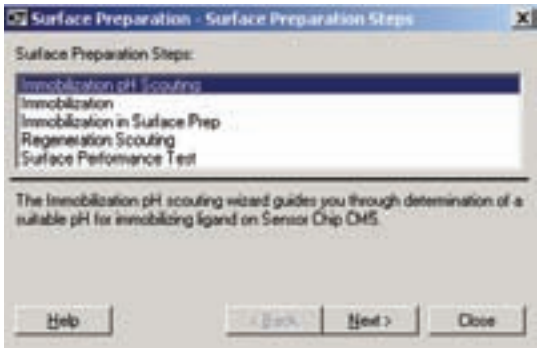
Run → **Run Application Wizard...**をクリックする。

↓

Run Application Wizard
Surface Preparation
Analyte Recovery
Binding Analysis
Kinetic Analysis
Customized Application
Start...
Use Template...
Cancel
The Surface preparation application wizard guides you through the essential steps in preparing the sensor surface for analysis, including immobilization pH scouting, ligand immobilization, regeneration scouting and surface performance test.

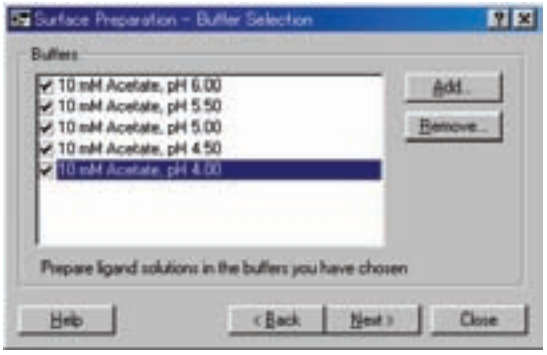
Surface Preparation を選択し、**Start...**をクリックする。

↓


Surface Preparation - Surface Preparation Steps
Surface Preparation Steps:
Immobilization pH Scouting
Immobilization
Immobilization in Surface Prep
Regeneration Scouting
Surface Performance Test
The Immobilization pH scouting wizard guides you through determination of a suitable pH for immobilizing ligand on Sensor Chip CM5.
Help
< Back
Next >
Close

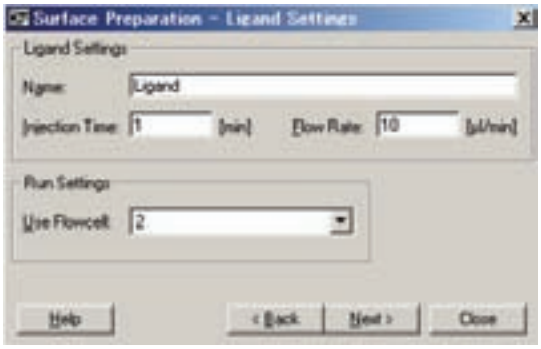
Immobilization pH Scouting を選択し、**Next** >をクリックする。

↓



検討する酢酸緩衝液の pH にチェックを入れ、**Next** >をクリックする。
表示された緩衝液以外を使用する場合には、**Add...**をクリックして設定する。削除したい項目は、ハイライトにした状態で **Remove...**をクリックする。

↓



Name リガンド名を入力する。

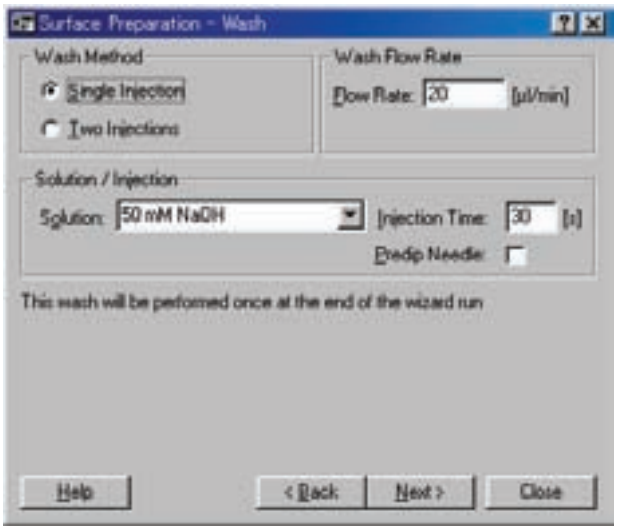
Injection Time 添加時間 1 min

Flow Rate 流速 10 µl/min

Use Flowcell 検討に使用するセル（固定化予定のセル）を選択する。

Next >をクリックする。

↓



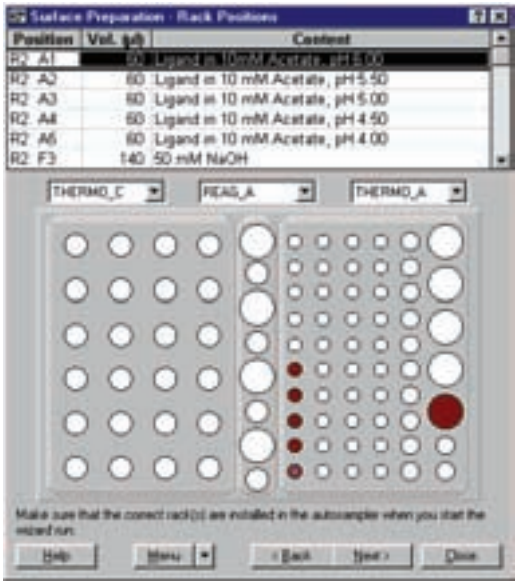
すべてのリガンド溶液添加終了後、センサーチップ表面に非特異的に吸着したリガンドの洗浄条件を設定する。2 種類の洗浄溶液を使用する場合には、**Wash Method** の **Two Injections** を選択する。

Solution 洗浄溶液名 50 mM NaOH

Injection Time 添加時間 30s

Next >をクリックする。

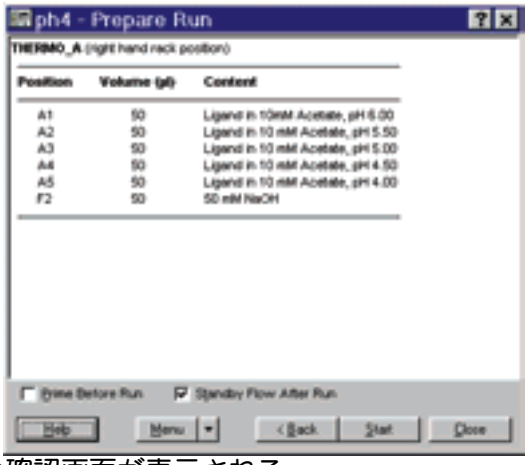
↓



サンプルおよび試薬の位置が表示される。
バイアルのセット位置を変更する場合には、ラック上のバイアルにカーソルを移動し､ドラッグして別の場所に移動する。その場合には、上部表中のサンプル位置も自動的に変更される｡サンプル位置の変更にともない、バイアルの大きさが変わる場合には、サンプル必要量も変更されるので注意する。
作成したウィザードを保存する場合は、**Menu▼ → Template Save As...**を実行する。

サンプルおよび試薬をセット後、**Next >**をクリックする。

↓



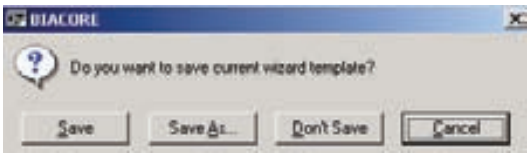
サンプルの位置、容量の確認画面が表示される。

Standby Flow After Run　　チェックを入れる。実験終了後、引き続き **Standby** を実行する。ランニング緩衝液を 5 µl/min で流し続ける操作。

Prime Before Run　　実験前に **Prime** を実行する場合にチェックを入れる。

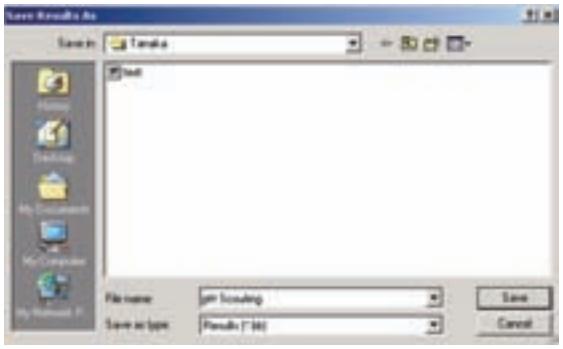
Start をクリックする。

↓



作成したウィザードプログラムをテンプレートとして保存するか確認される。通常は、**Don't Save** をクリックする。（結果ファイルに、作成メソッドは必ず残る。補足 11 参照。）

↓



保存先のフォルダを指定し、ファイル名を入力し、**Save** をクリックする。

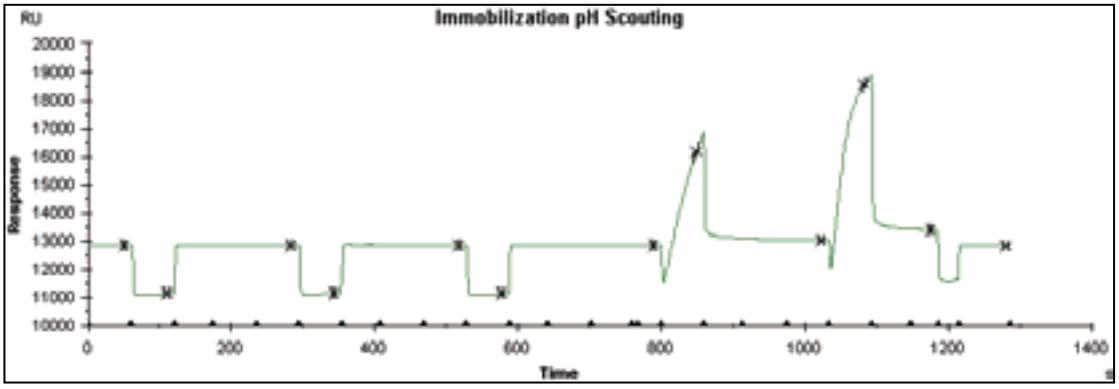
↓

実験がスタートする。

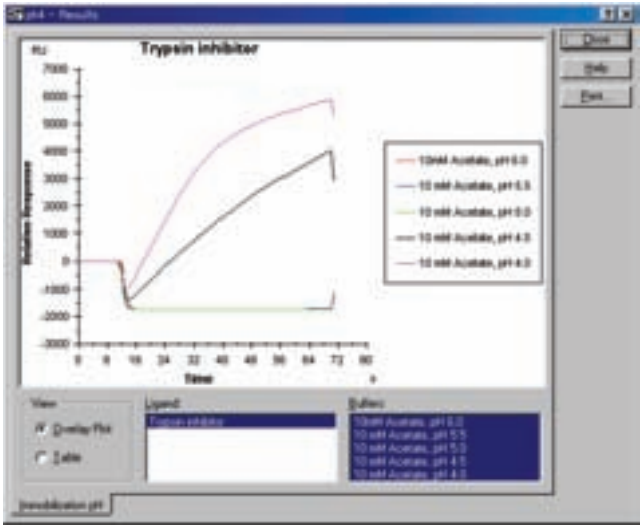
緊急停止したい場合は、キーボードの **Ctrl（左下）＋ Break（右上）**を同時に押す。

↓

実験が終了すると、センサーグラムと結果が表示される。



Fc	APROG	Time	AbsResp	Slope	Baseline	RelResp	Id	Ligand
2	ImmobPH	58.5	12874.8	-0.02	Yes	0	Baseline1	Trypsin inhibitor
2	ImmobPH	118.5	11153.6	0.58	No	-1721.2	10mM Acetate, pH 6.00	Trypsin inhibitor
2	ImmobPH	283.5	12872.6	-0.01	Yes	-2.2	Baseline2	Trypsin inhibitor
2	ImmobPH	343.5	11160.2	0.71	No	-1712.4	10 mM Acetate, pH 5.50	Trypsin inhibitor
2	ImmobPH	517.5	12874.1	-0.02	Yes	1.5	Baseline3	Trypsin inhibitor
2	ImmobPH	577.5	11153.8	0.41	No	-1720.3	10 mM Acetate, pH 5.00	Trypsin inhibitor
2	ImmobPH	788.5	12873.7	-0.01	Yes	-0.4	Baseline4	Trypsin inhibitor
2	ImmobPH	848.5	16126.0	73.68	No	3252.3	10 mM Acetate, pH 4.50	Trypsin inhibitor
2	ImmobPH	1022.5	13047.5	-0.28	Yes	173.0	Baseline5	Trypsin inhibitor
2	ImmobPH	1082.5	18542.7	39.51	No	5495.2	10 mM Acetate, pH 4.00	Trypsin inhibitor
2	ImmobPH	1175.5	13408.4	-1.21	Yes	361.0	PreRegen	Trypsin inhibitor
2	ImmobPH	1280.5	12836.8	-0.16	No	-571.6	Regeneration	Trypsin inhibitor



上記の結果から使用する pH を決める。結果の評価は、補足 9 を参照。

補足 9. Immobilization pH Scouting の結果の評価

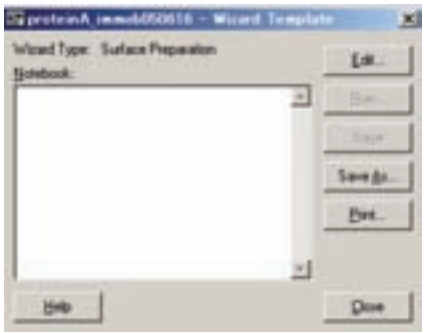
濃縮効果は、希釈緩衝液の pH を下げれば増加する。しかし、低い pH 環境下では、活性型 NHS 基とアミノ基とのカップリング効率は減少する。上記のセンサーグラムの場合、pH4 のほうが pH4.5 に比べ速い速度で濃縮しているが、活性化 NHS 基とアミノ基のカップリング効率は、pH8.5 前後が至適であるため、必ずしも pH4 で固定化量が多いとは限らない。また、タンパク質の安定化のためにはできるだけ高めの pH を使用すべきである。したがって、濃縮効果のある、一番高い pH 条件を使用する。上記の場合、pH4.5 が妥当である。

補足 10.　ウィザード結果の再表示方法

測定が終了すると、ウィザード結果が自動的に表示される。閉じてしまったあとに再表示するには、**View → Wizard Results...**をクリックする。

補足 11.　ウィザードの測定内容の表示方法

測定内容を確認したい場合は、結果ファイルを開いた状態で、**View → Wizard Template...** をクリックする。



↓

Edit...をクリックすると、そのときのテンプレートを開くことができる。

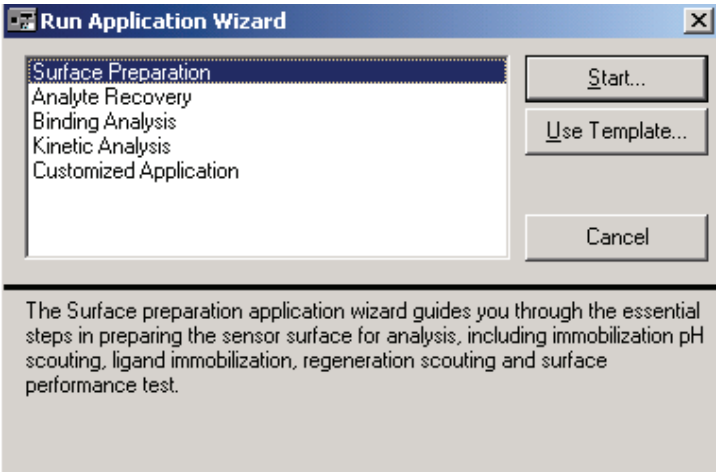
3-1-2. 標準プロトコールでの固定化

Run → Run Application Wizard...をクリックする。

↓

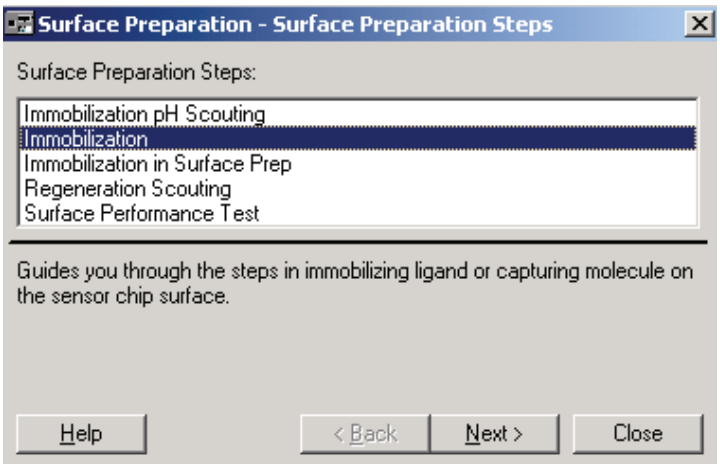
BIACORE 3000 Control Software on COM1
File Edit View Command Run Tools Window Help
Run Sensorgram...
Run Application Wizard...
Run Method...
Data Collection Rate

↓


Run Application Wizard
Surface Preparation
Analyte Recovery
Binding Analysis
Kinetic Analysis
Customized Application
Start...
Use Template...
Cancel
The Surface preparation application wizard guides you through the essential steps in preparing the sensor surface for analysis, including immobilization pH scouting, ligand immobilization, regeneration scouting and surface performance test.

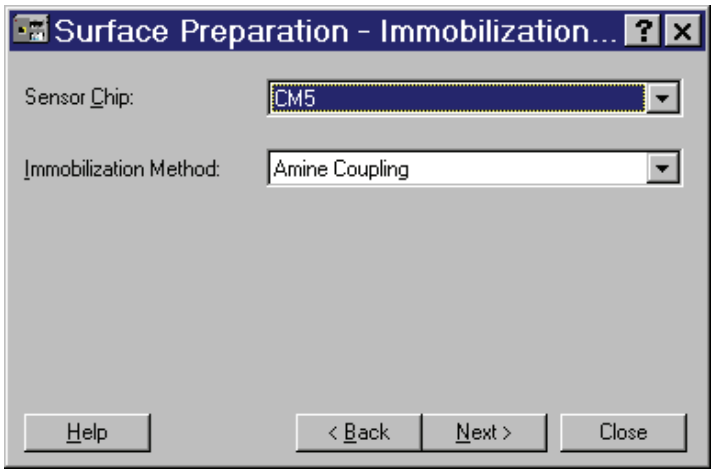
Surface Preparation を選択し、**Start...**をクリックする。

↓


Surface Preparation - Surface Preparation Steps
Surface Preparation Steps:
Immobilization pH Scouting
Immobilization
Immobilization in Surface Prep
Regeneration Scouting
Surface Performance Test
Guides you through the steps in immobilizing ligand or capturing molecule on the sensor chip surface.
Help
< Back
Next >
Close

Immobilization を選択し、**Next >**をクリックする。

↓

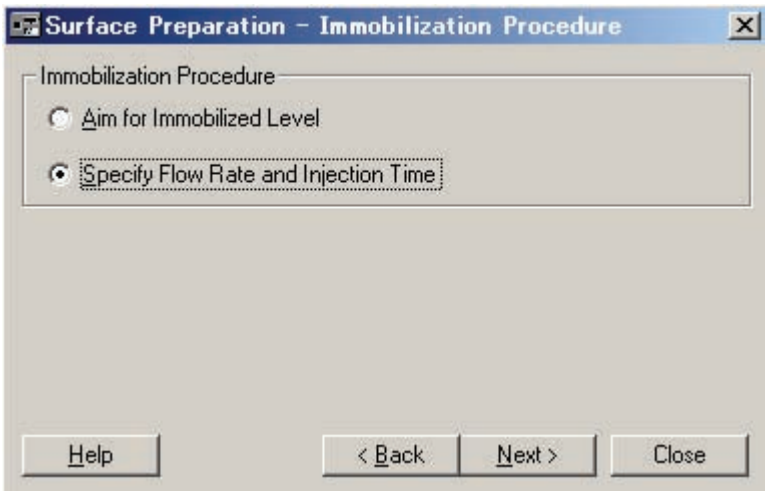


Sensor Chip　　CM5

Immobilization Method　　Amine Coupling

Next ＞をクリックする。

↓



Aim for Immobilized Level

目的の固定化量に調節しながら固定化する場合に選択する。(3-1-3 章参照)

Specify Flow Rate and Injection Time

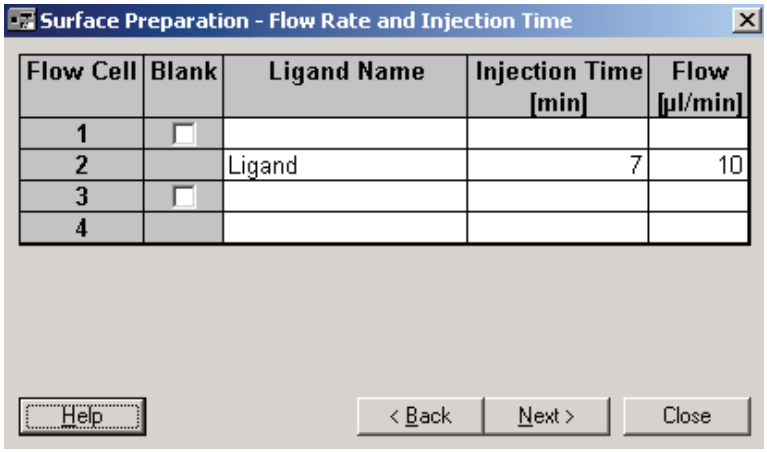
リガンド添加時の流速と添加時間を指定し、固定化する場合に選択する。

Specify Flow Rate and Injection Time を選択し、**Next** ＞をクリックする。

補足 12. 標準プロトコールの固定化ステップ

①	NHS 活性化	5 µl/min	7 分間
②	リガンドのカップリング	自由に設定	自由に設定 （標準 7 分間）
③	エタノールアミンによるブロッキング	5 µl/min	7 分間

↓



Ligand Name　固定化するフローセルにリガンド名を入力。
Injection Time　リガンド添加時間　7 min
Flow　流速　10 µl/min

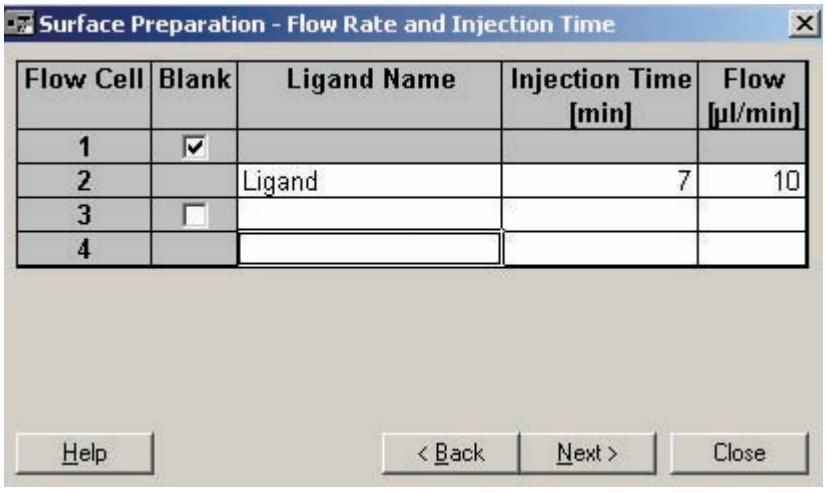
Next >をクリックする。

↓

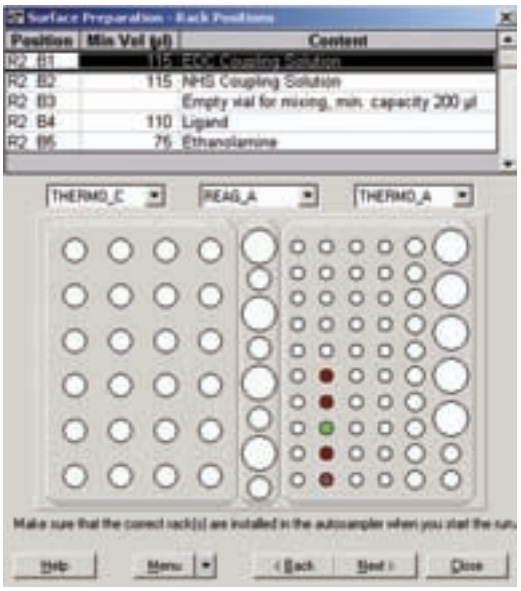
補足 13. 複数のフローセルに同時に固定化する方法

① 複数リガンドの固定化を同時におこなう場合には、それぞれのフローセルにリガンド名と目的の固定化量を入力する。

② フローセル 1 および 3 は、リファレンスセルとして使用することができる。リファレンスセルは必ず設定する（4 章参照）。
Blank にチェックを入れると、NHS 活性化後、エタノールアミンでブロッキングしたセルを作成する。

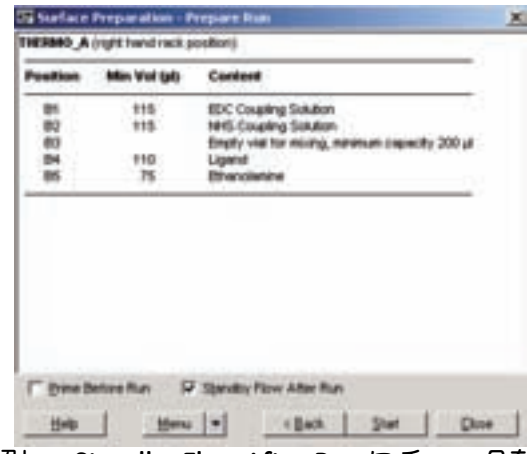


③ 何も処理していないフローセルをリファレンスセルにする場合には、この画面上で設定をおこなう必要はない。



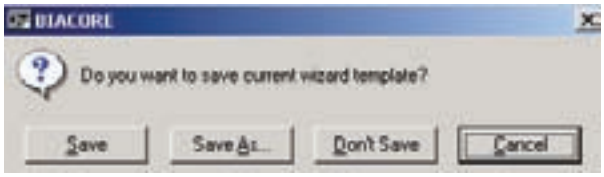
サンプルおよび試薬をセットする。（EDC および NHS は、解凍したものをそのままセットする。EDC/NHS の自動等量混合用の空のバイアルをセットする。）
Next >をクリックする。

↓



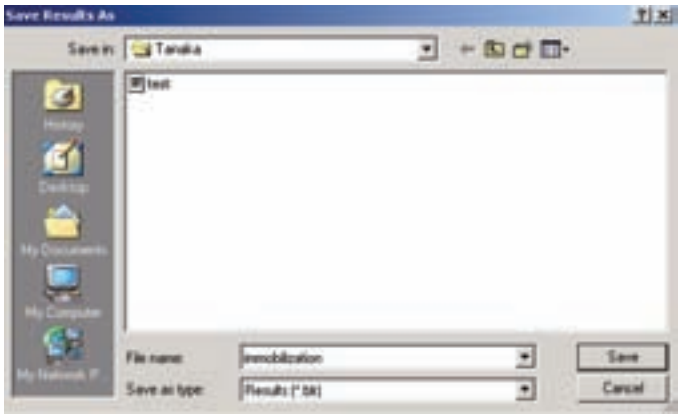
位置および容量を再確認し、**Standby Flow After Run** にチェックを入れる。必要があれば **Prime Before Run** にチェックを入れる。
Start をクリックする。

↓



作成したウィザードプログラムをテンプレートとして保存するかどうか、メッセージが表示される。通常は **Don't Save** をクリックする。（結果ファイルに、作成メソッドは必ず残る。補足 11 参照。）

↓



保存先のフォルダを指定し、ファイル名を入力し、**Save** をクリックする。

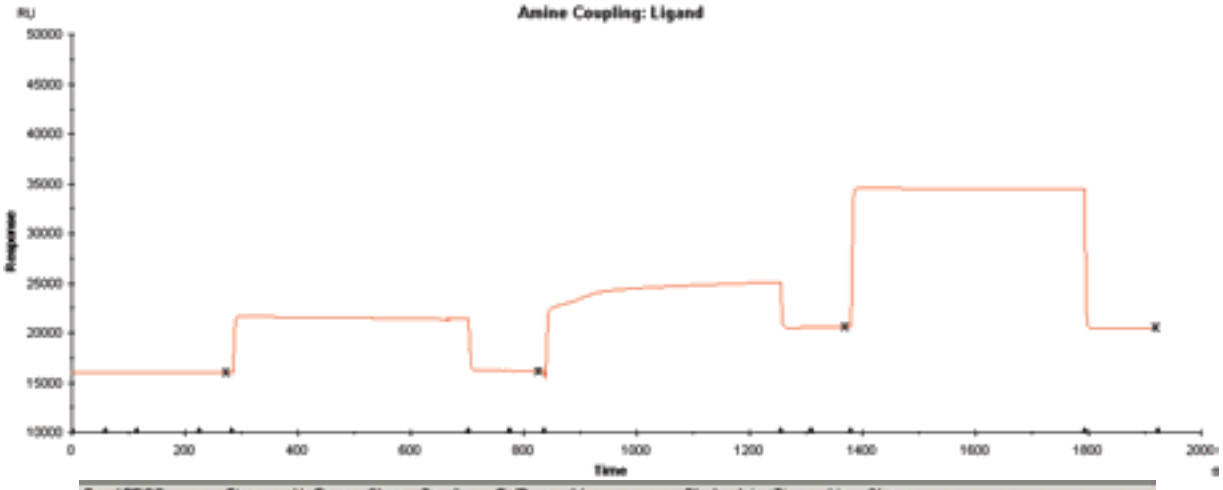
↓

固定化が開始する。

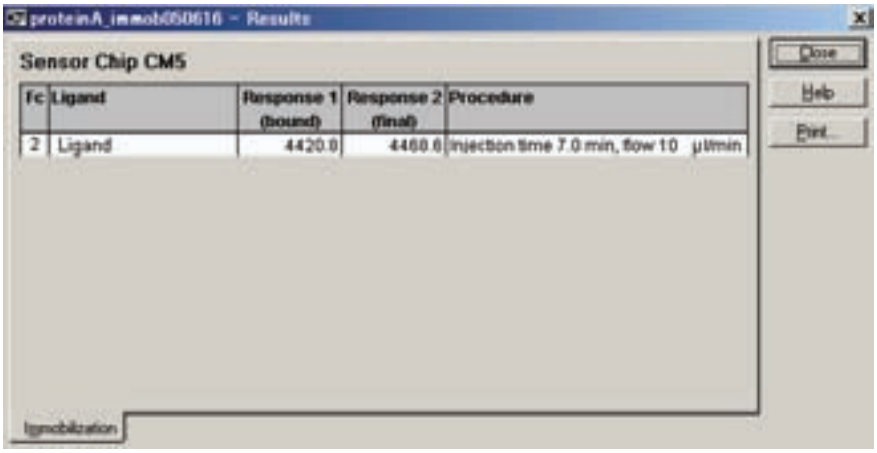
緊急停止したい場合は、キーボードの **Ctrl（左下）＋ Break（右上）**を同時に押す。

↓

実験が終了すると、センサーグラムと固定化結果が表示される。



Fc	APROG	Time	AbsResp	Slope	Baseline	RelResp	Id	Blank	InjectTime	LigandName
2	FlowAndTime	272.5	16072.7	0.04	Yes	0	Baseline	No	7	Ligand
2	FlowAndTime	825.5	16204.8	-0.09	No	132.0	EDC/NHS	No	7	Ligand
2	FlowAndTime	1368.5	20625.6	0.36	No	4552.8	Ligand	No	7	Ligand
2	FlowAndTime	1918.5	20541.3	0.03	No	4468.6	Ethanolamine	No	7	Ligand



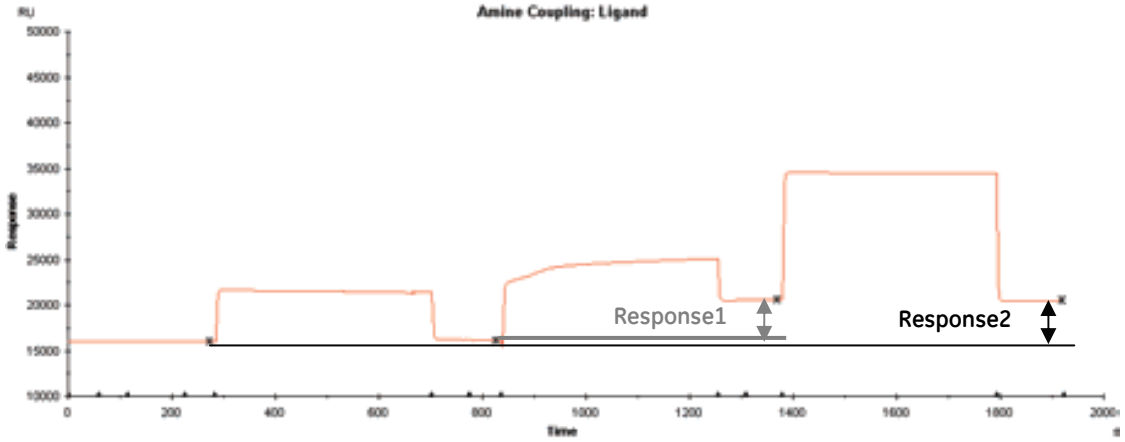
Fc	Ligand	Response 1 (bound)	Response 2 (final)	Procedure
2	Ligand	4420.0	4460.6	Injection time 7.0 min, flow 10 µl/min

補足 14. 固定化量の評価

固定化のレポートポイントは、以下の 2 つが表示される。

Response 1（RU）　　リガンド添加の前後でのレスポンス差

Response 2（RU）　　NHS 活性前とエタノールアミン添加後のレスポンス差

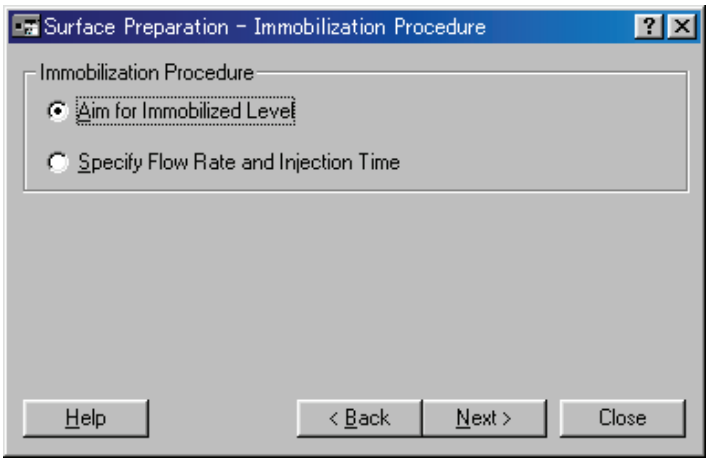


レスポンスが小さいほうを固定化量として採用する。

リガンドが凝集している場合やセンサーチップ表面に吸着する場合は、エタノールアミンを添加することにより表面に残ったリガンドは洗い流されるため、Response 2 は Response 1 より小さくなる。また、固定化量が少ない場合は、NHS 化した部分の大半にエタノールアミンが導入されるため、Response 2 は Response 1 より大きくなることがある。

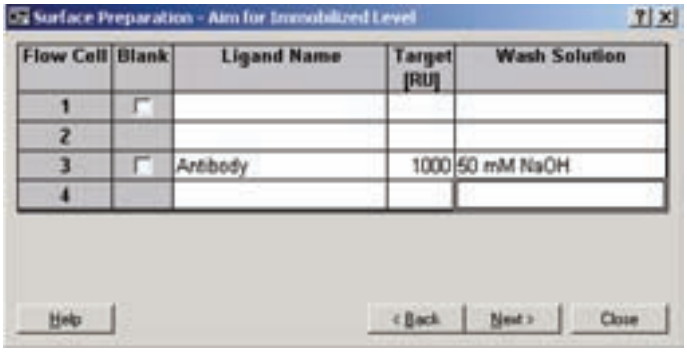
3-1-3. 固定化量を調節して固定化

Immobilization ウィザードの実行は、3-1-2 章を参照にする。
固定化方法の選択ステップから説明する。



Aim for Immobilized Level 選択し、**Next** >をクリックする。

↓



Ligand Name　固定化するフローセルにリガンド名を入力する。
Target　目的の固定化量（RU）を入力する。
Wash Solution　リガンド溶液テスト添加後の洗浄溶液（通常、50 mM NaOH）を入力する。

複数セルへの固定化と **Blank** の設定については、補足 13 参照。
Next >をクリックする。

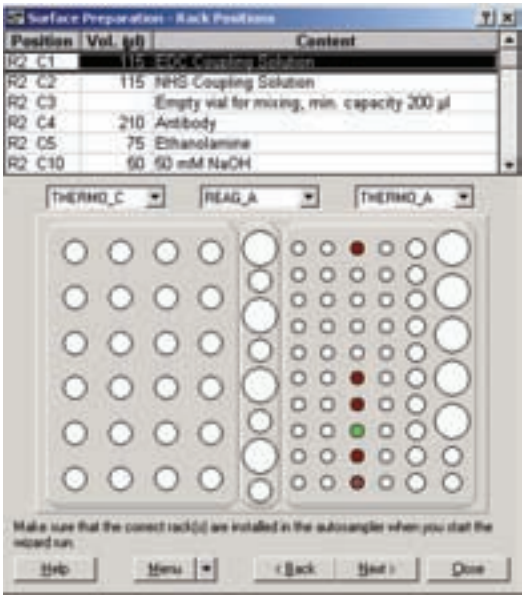
補足 15. 固定化量を調節する場合の固定化ステップ

① リガンド溶液のテスト添加
リガンド溶液を添加し、濃縮効果を確認する。濃縮レスポンスより、目的の固定化量（RU）が得られるか評価する。明らかに目的の固定化量が得られないと判断した場合には、洗浄操作後、プログラムは中断する（補足 16 参照）。

② 洗浄

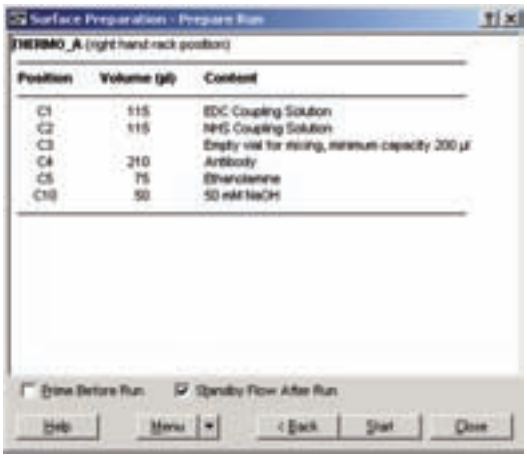
③ NHS 活性化	5µl/min	7 分間
④ リガンドのカップリング	5µl/min	ターゲット量固定化できるまで添加
⑤ エタノールアミンによるブロッキング	5µl/min	7 分間

↓



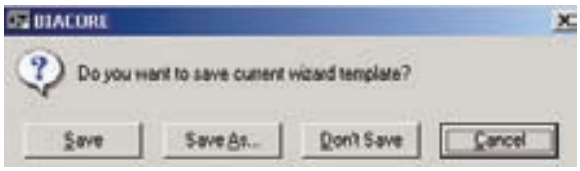
リガンドおよび試薬の位置がラック上に表示される。セット後 **Next>**をクリックする。

↓



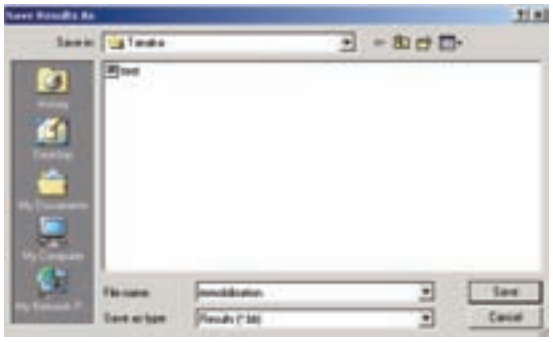
バイアル位置、容量を再度確認し、**Standby Flow After Run** にチェックを入れる。必要があれば、**Prime Before Run** にもチェックを入れる。 **Start** をクリックする。

↓



作成したウィザードプログラムをテンプレートとして保存するかどうか、メッセージが表示される。通常 **Don't Save** をクリックする。（結果ファイルに、作成メソッドは必ず残る。補足 11 参照。）

↓

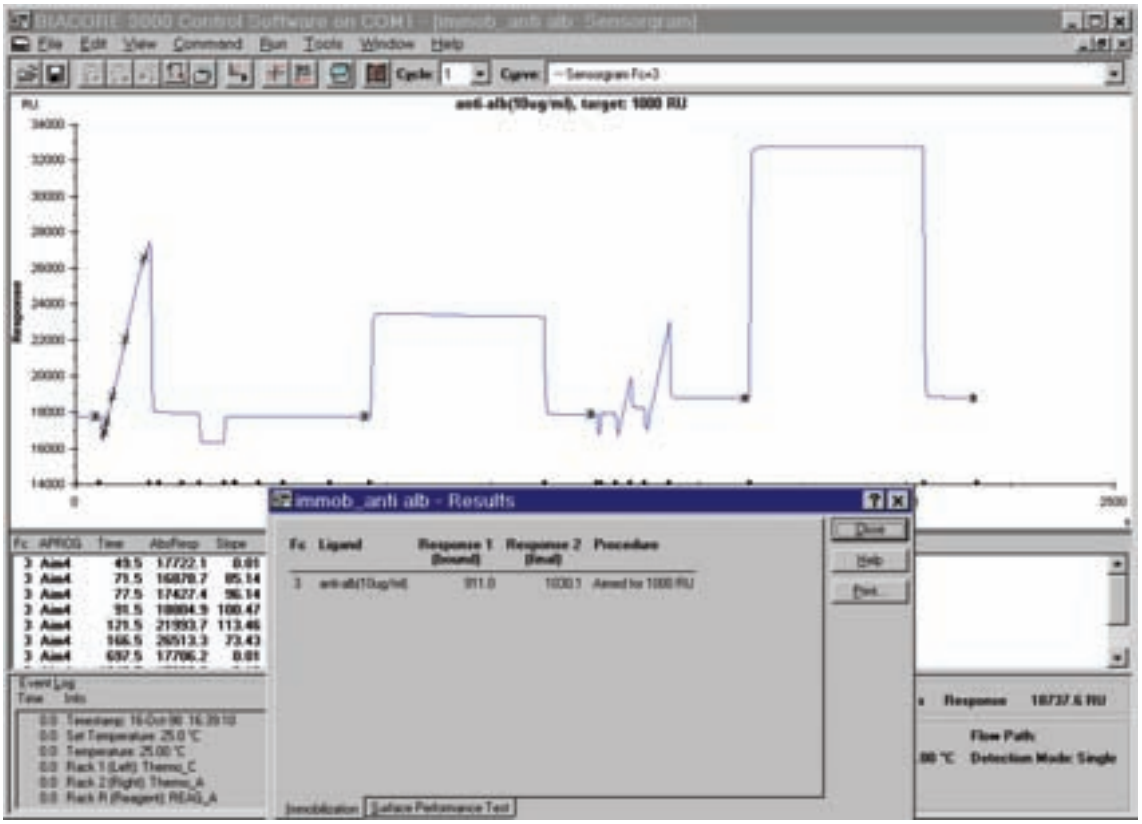


保存先のフォルダを選択し、ファイル名を入力し、**Save** をクリックする。

↓

固定化が開始する。

緊急停止したい場合は、キーボードの **Ctrl（左下）＋ Break（右上）**を同時に押す。

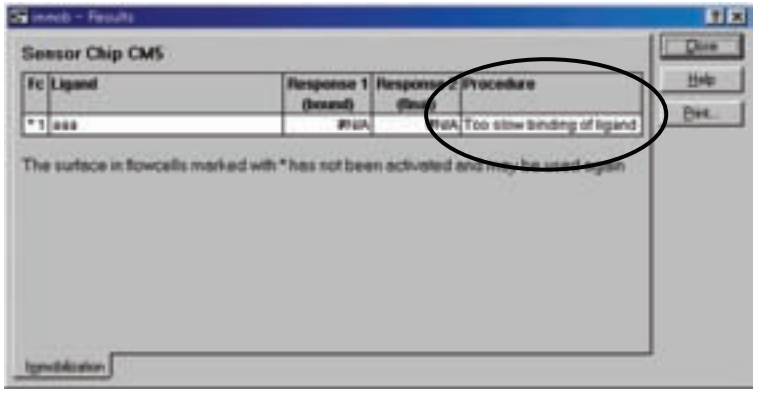


Response 1 および 2 については補足 14 を参照。

補足 16. 固定化ウィザードの中断

Aim for immobilized Level ウィザードでは、NHS 活性化を実行する前に、リガンド溶液をテスト添加し、濃縮効果が得られるか、また、その結果から目的の固定化量が調節できる条件であるかを判断する。

リガンド条件に問題がある場合、この時点でプログラムが自動的に終了する。中断理由が表示される。リガンドは固定化されていないので、リガンド溶液を調製しなおして、同じフローセルに再度固定化を試みる。



Too fast binding of ligand

濃縮効果が強すぎ、添加時間を短くしても目標のレベル以上固定化されると判断。

希釈緩衝液の pH を上げるか、リガンド濃度を下げることにより、濃縮効果を下げて再度固定化し直す。

Too slow binding of ligand

濃縮効果が不十分または観察されず、添加時間を長くしても目標のレベルまで固定化できないと判断。

希釈緩衝液の pH を下げるか、リガンド濃度を上げることにより、濃縮効果を上げて再度固定化し直す。

4. 相互作用測定の条件検討

リガンドの固定化が終了したら、マニュアル操作により、アナライトの特異的結合の確認をおこなう。引き続き、再生条件の検討をおこなう。再生条件が決まったら、同一濃度のアナライトを添加し、再現性の確認をおこなう。

アナライト

リガンドを固定化したセンサーチップに対して、リガンドとの結合を測定する目的で添加する分子。血清や培養上清等のクルード（crude）なサンプルを使用できるが、不溶性の粒子等は遠心などで除去する。反応速度定数や解離定数算出を目的とした実験の場合は、精製したモル濃度が既知のアナライトが必要となる。

アナライトの調製

ランニング緩衝液で希釈する。希釈できない場合は、ランニング緩衝液でゲルろ過等を使用しバッファー交換するか、ランニング緩衝液自体をアナライト溶解液条件にあわせることが必要となる場合がある。緩衝液が異なる場合には、溶液効果（Bulk Effect：バックを流れている緩衝液の密度の差により発生するレスポンスの差）が発生する。溶液効果はスクリーニングのように結合の有無を評価することを目的とした実験においては問題とならないが、反応速度定数や解離定数の算出を目的とした実験においては、結合領域と解離領域が異なる緩衝液組成条件下になり解析結果に影響を与える。

アナライト濃度は結合の強さや分子量にもよるが、数十 ng/ml～数百 µg/ml でおこなう。反応速度定数を算出する場合には、予想される K_D（解離定数）値濃度の 1/10～10 倍の濃度で解析すると良好な結果が得られる。予備検討時は、結合が弱いことや再生条件（リガンドに結合したアナライトを溶出し、リガンド固定化表面を固定化直後の状態に再生する操作）を検討する必要性を考慮し、濃い目の濃度（タンパク質アナライトの場合、数～数十 µg/ml）を用いるのが望ましい。

リファレンスセル

溶液効果および非特異的吸着を差し引くために、必ずリファレンスセルへもアナライトを添加する。リファレンスセルは、未処理のセル、活性化・ブロッキングセル、ネガティブコントロール固定化セルなどを利用する。

再生溶液

リガンドに結合したアナライトを強制的に解離させる操作を再生という。解離が速い相互作用では、短時間でアナライトが完全に解離するため、再生の必要がない。解離速度が遅い相互作用の場合には、適当な塩、酸、アルカリ溶液をアナライト結合表面に 30 秒～1 分

間添加し再生をおこなう。至適な再生条件（どの溶液で何分間、何回添加するか）は、分子間ごとに異なるため、その都度検討が必要となる。

理想的な再生条件

リガンドの活性が失われない
アナライトを完全に解離する
リガンドがセンサーチップ表面から遊離しない

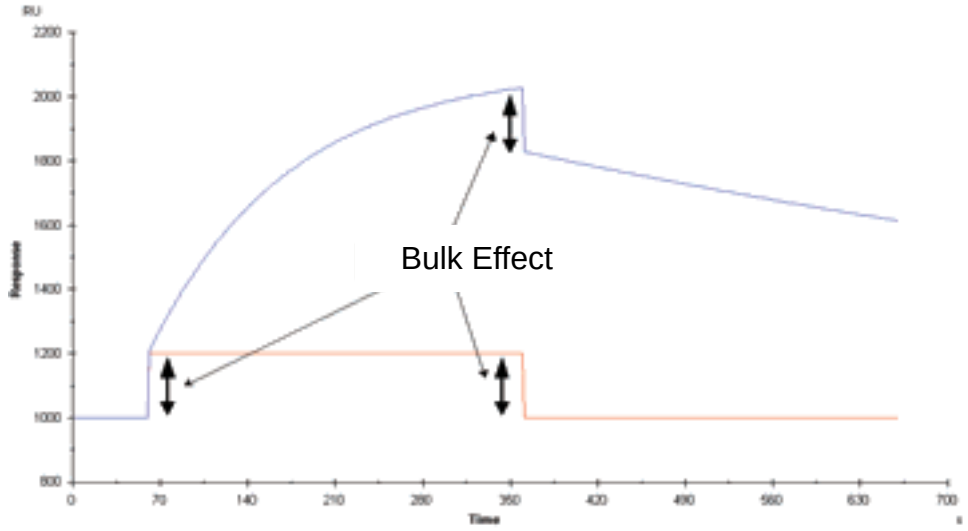
補足 17. 再生溶液の種類

再生溶液は通常以下のようなものが使用される。検討の際にはマイルドな条件から検討をおこなう（塩溶液□酸溶液□アルカリ溶液）。

試薬	濃度あるいは pH
塩	
NaCl	< 2 M
酸性条件	
10 mM Gly-HCl	> pH 1.5
HCl	< 100 mM
Phosphoric acid	< 100 mM
Formic acid	< 20 %
アルカリ条件	
10 mM Gly-NaOH	< pH 12
NaOH	< 100 mM
Ethanolamine	< 100 mM
Ethanolamine-HCl	< 1 M
キレート剤　多価カチオン依存性反応の場合	
EDTA	< 0.35 M
界面活性剤	
Surfactant P-20 (Tween 20)	< 5 %
Triton X-100	< 5 %
SDS	< 0.5 %
Octylglucoside	< 40 mM
有機溶媒	
Acetonitrile	< 20%
DMSO	< 8%
Ethyleneglycol in HBS buffer	< 50%
Ethanol	< 20%
Formamide	< 40%
変性剤	
Guanidine-HCl	< 5M
Urea	< 8

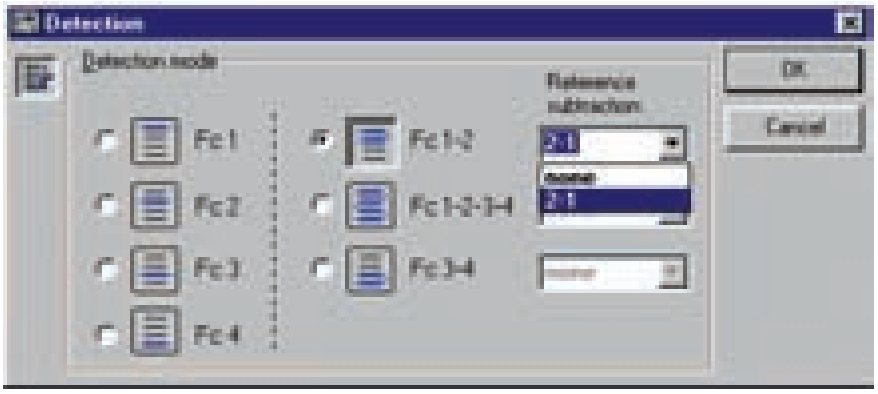
補足 18. 溶液効果（Bulk Effect）

アナライトは、できるだけランニング緩衝液で希釈する。アナライト溶解液とランニング緩衝液の組成が異なる場合には、溶液効果(Bulk Effect)が大きくなる。



4-1. マニュアル操作による相互作用の条件検討

アイコン（ ）あるいは **Run** → **Run sensorgram...**をクリックし、センサーグラムをスタートする。

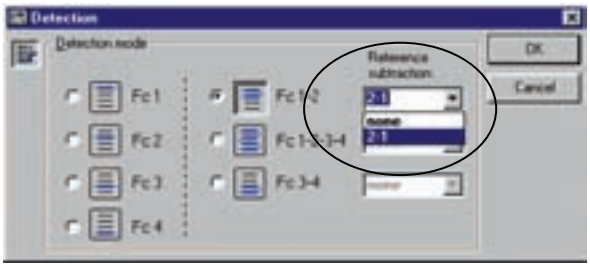


使用するフローセルの選択およびリファレンス差し引き機能の選択をおこない、**OK** をクリックする。補足 19 参照。

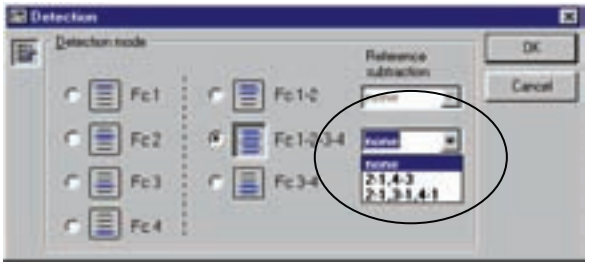
↓

補足 19. 流路の選択

相互作用測定では、リファレンスセルにも同時にアナライトを添加する。この場合、**Detection** 画面で、複数のセルを選択後、リファレンスサブトラクションも設定する。リファレンスセルのレスポンスを差し引いたセンサーグラムを測定時に表示可能となる。
なお、リファレンスセルは、フローセル 1 または 3 で設定されている。

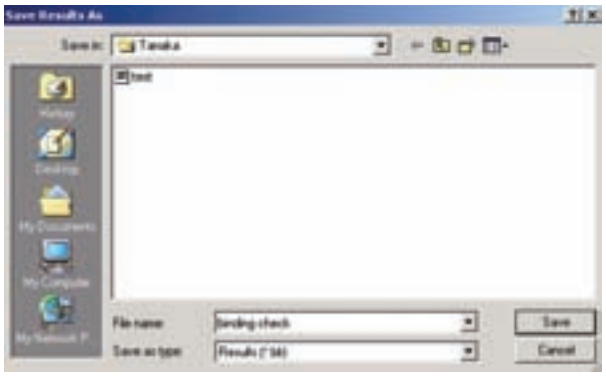


上図の場合、フローセル 1 をリファレンスにして、フローセル 2 のセンサーグラムからフローセル 1 のセンサーグラムを差し引きしたグラフを表示することができる。
Fc1-2-3-4 を選択すると、以下のボックスの各種差し引きセンサーグラムを表示することができる。



流速を設定し、**OK** をクリックする。
反応速度定数（k_a、k_d）を算出する場合には比較的速い流速（**20～50 µl/min**）に設定する。

↓



保存先のフォルダを指定し、ファイル名を入力し、**Save** をクリックする。

↓

センサーグラムが表示され、測定が開始される。
緊急停止したい場合は、キーボードの **Ctrl（左下）＋ Break（右上）**を同時に押す。

↓

補足 20. センサーグラムの表示の変更

View → Plot Single 選択したセンサーグラム 1 本を表示する。
画面右上の **Curve**：

の▼をクリックし、表示センサーグラムを選択する。

View → Plot Overlay　すべてのセンサーグラムを表示することができる。

View → Plot Curve Classes　表示センサーグラムの種類が多い場合には、センサーグラムの種別で表示変更することができる。
Curves:を選択することで、各フローセルのセンサーグラムもしくは差し引きセンサーグラムのいずれかを選択して表示することができる。

アナライトの結合確認

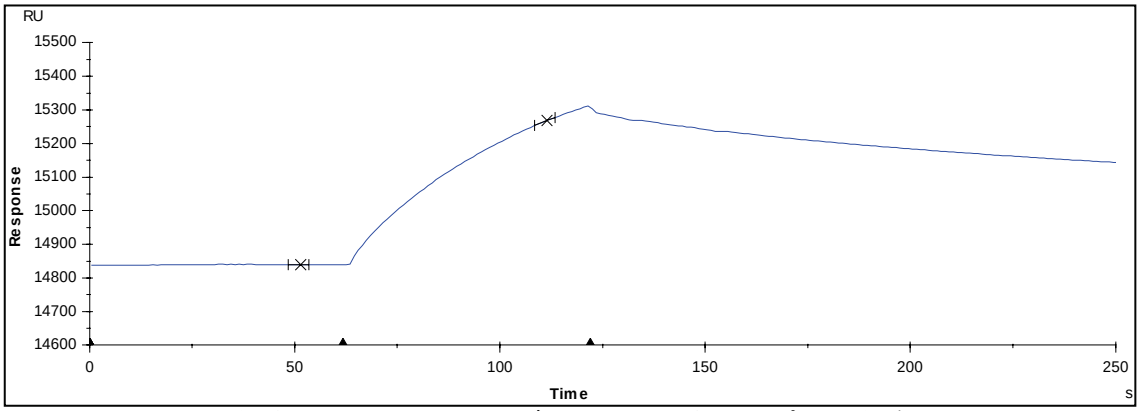
アイコン（ ）あるいは **C**ommand → **I**nject...をクリックする。

INJECT の右の▼をクリックすると各種の添加コマンドが表示される(補足 21 参照)。

添加コマンド、サンプルの位置、容量、その他必要事項を入力する。

Start Injection をクリックする。

↓



リファレンスセルを差し引いたセンサーグラムで、結合レスポンスを確認する。また、リファレンスセルのセンサーグラムで、非特異的吸着の有無を確認する。

↓

補足 21. 添加コマンドの種類

コマンド	内容	試料添加量	試料消費量
INJECT	通常使用のモード	5-325µl	+30µl
KINJECT	反応速度を算出する際に有効 解離時間を入力する	10-250µl	+40µl
QUICKINJECT	試料の必要量が少ない 測定開始までの待ち時間が少ない	5-325µl	+10µl
COINJECT	２つのサンプルを間隔を空けず連続して添加できる		
	Sample 1：	0-100µl	+40µl
	Sample 2：	0-100µl	+40µl
BIGINJECT	大容量の試料を添加する	325-750µl	+52µl
MANUAL INJECT	小刻みに添加する	任意	+30µl

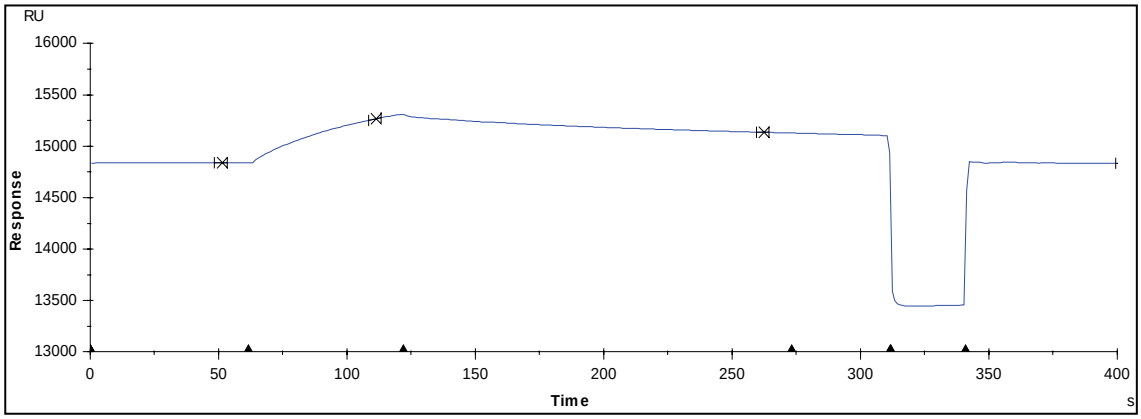
再生条件の検討

解離状態を観察後、必要に応じて再生溶液を添加する。

アイコン（ ）あるいは **Command** → **Inject...**をクリックする。

再生条件を入力し、**Star Injection** をクリックする。

↓



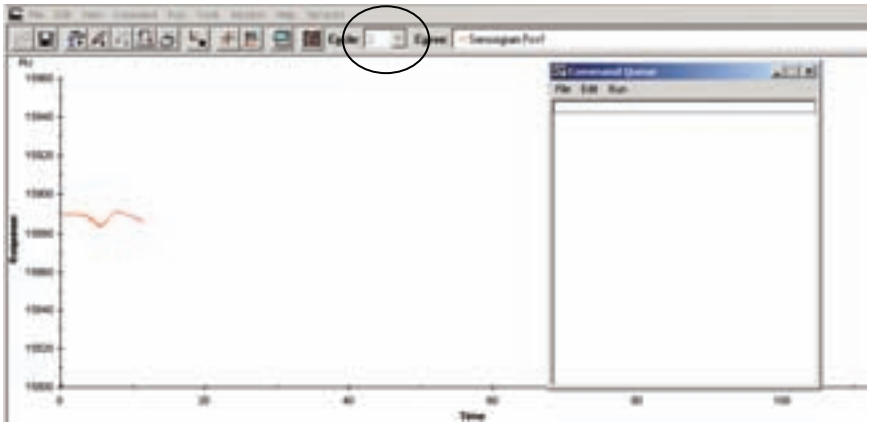
固定化セルのセンサーグラムで、再生条件が至適か確認する。（補足 22 参照）

↓

さらに条件検討するサンプルがある場合

Run → **Start New Cycle...**をクリックする。

↓



同一ファイルに、2 サイクル目として、測定が新たに開始される。アナライトの添加および再生を繰り返す。

↓

測定の終了

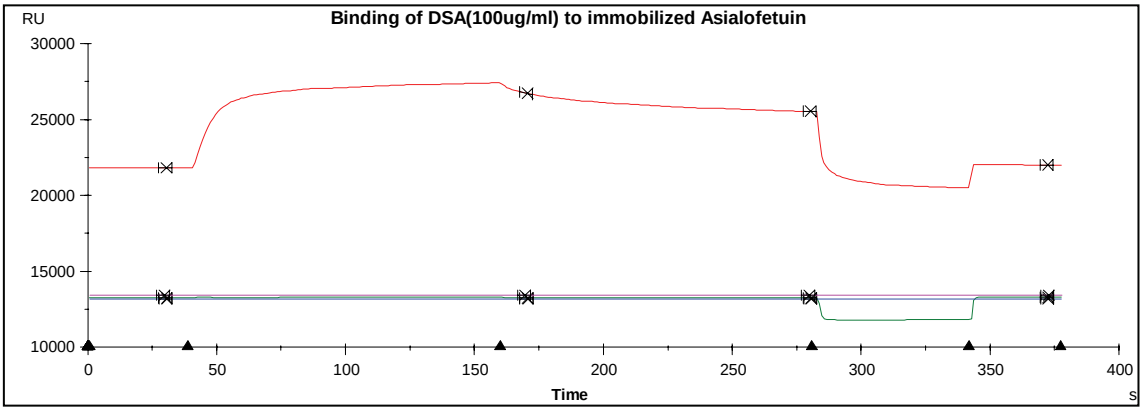
アイコン（ ）あるいは **Run** → **Stop Sensorgram** をクリックする。

補足 22. 結合レスポンスおよび再生条件の確認

レポートポイントの記録による確認

レポートポイントの記録方法は、2 章を参照。

通常、結合レスポンスは、サンプル添加前 10 秒程度の時間でベースラインをとり、サンプル添加終了 10 秒～30 秒後を結合量として評価する。
複数のセンサーグラムを検出している場合、レポートポイント記録画面の **Apply to All Curves** にチェックを入れると、全センサーグラムにポイントを記録することができる。



Fc	APROG	Time	Window	AbsResp	SD	Slope	Baseline	RelResp	Id
1	assay	30.5	5.0	21051.2	0.27	-0.05	Yes	0	Baseline
2	assay	30.6	5.0	13243.6	0.15	-0.07	Yes	0	Baseline
3	assay	30.7	5.0	13193.0	0.14	-0.05	Yes	0	Baseline
4	assay	29.8	5.0	13424.3	0.09	0.02	Yes	0	Baseline
1	assay	170.5	5.0	26755.4	68.27	-36.99	No	4904.2	bound
2	assay	170.6	5.0	13255.5	0.43	0.21	No	11.9	bound
4	assay	169.8	5.0	13422.5	0.20	0.04	No	-1.8	bound

Status window のレスポンスを利用した確認

アイコン（ ）あるいは **View** → **Reference Line** をクリックし、センサーグラム上にリファレンスラインを表示させる。

↓

マウスのカーソル（矢印）をリファレンスラインの縦線上に移動後、マウスの左クリックでドラッグし、ベースラインを取りたい時間に移動するか、もしくはベースラインを取りたい場所のセンサーグラム上の位置でカーソルをクリックし、リファレンスラインを移動する。

↓

View → **Base Line** をクリックすると、ステータスウインドウのレスポンスが相対値 0 となる。リファレンスラインの縦軸にもう一度カーソルをあわせ、左ボタンでドラッグし移動させると、ベースラインとして設定した位置からのレスポンスが表示される。

補足 23. Command Queue

マニュアル操作でセンサーグラムを開始すると **Command Queue** ボックスがセンサーグラム画面右上に表示される。このボックスでは、マニュアル操作で入力したコマンドを確認することができる。右上の縮小ボタンをクリックしてアイコン化(縮小)することができる。また、アイコンをクリックすると再びボックスを開くことができる。

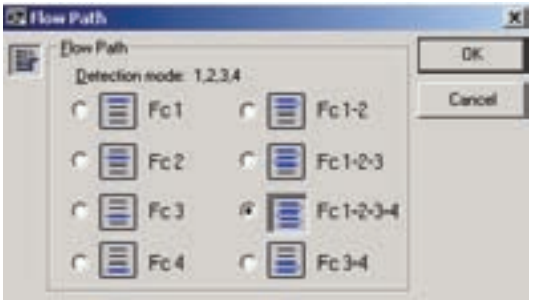
コマンドは入力順に自動実行される。入力したコマンドを削除する場合には、該当のコマンドを選択後、 **Edit** → **Delete** をクリックする。新たにコマンドを挿入する場合には、**Edit** → **Insert** をクリックし、コマンドを追加する。

補足 24. 測定中の流速の変更

アイコン（ ）もしくは **Command** → **Flow...**を選択する。

補足 25. 測定中の流路の変更

Command → **Flow Path...**をクリックする。



変更したい流路にチェックを入れ、**OK** をクリックする。

補足 26. 添加の中止

添加を途中で中止したい場合には、添加開始後、アイコン ）もしくは **Command** → **Stop Inject** をクリックする。

残ったサンプルを、設定したバイアルに戻すか、廃液に流すか指定し、**OK** をクリックする。

補足 27. 添加コマンドの拡張機能

添加コマンドには、以下の拡張機能がある。

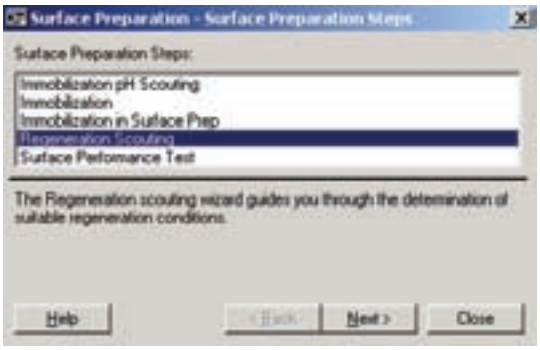
More >>をクリックする。

Predip Needle	**Position** で指定した溶液で、添加前にニードルの洗浄をおこなう。
Extra Cleanup	添加後の、ニードル、流路などのランニング緩衝液による洗浄を、通常よりも念入りにおこなう。

4-2. ウィザードによる相互作用の条件検討

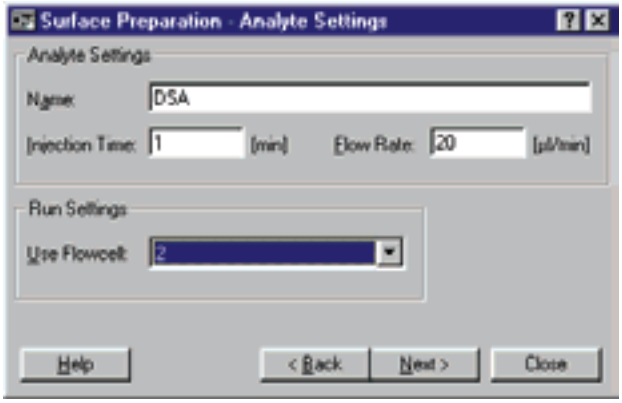
4-1 章では、マニュアル操作による再生条件の検討方法を紹介したが、ウィザードで検討することもできる。しかし、コントロールセルを設定することができないので、非特異的吸着を確認することができないので注意する。

Run → **Run Application Wizard...** → **Surface Preparation** を選択し、**Start...**をクリックする。



Regeneration Scouting を選択し、**Next** >をクリックする。

↓



Name アナライト名

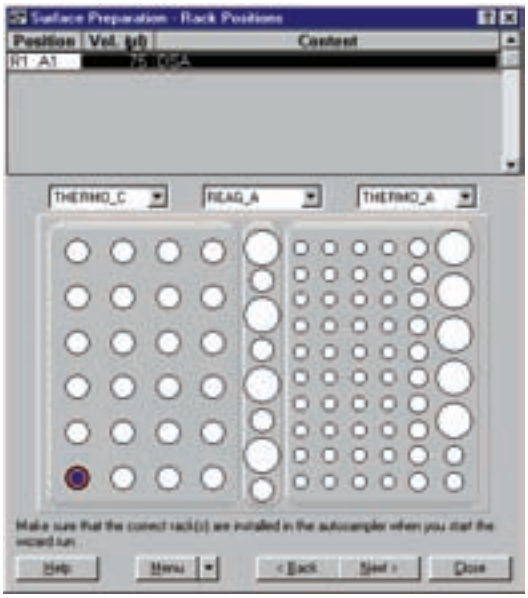
Injection Time 添加時間 2～5 min 程度

Flow Rate 流速 10～20 µl/min 程度

Use Flowcell 使用するフローセル（リガンドを固定化セル）を選択。

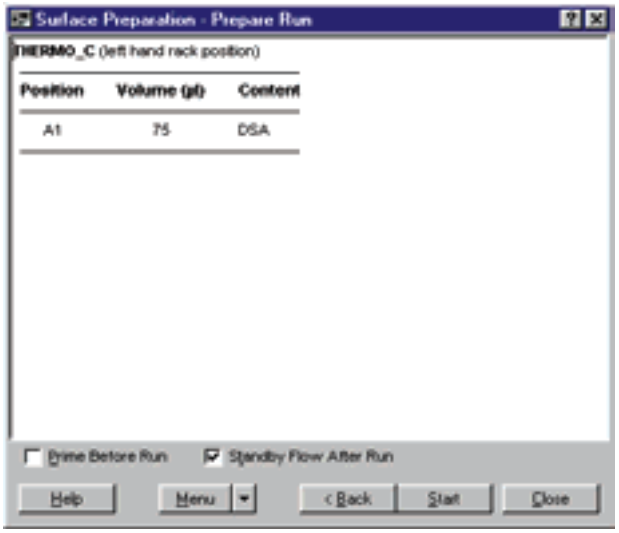
Next >をクリックする。

↓



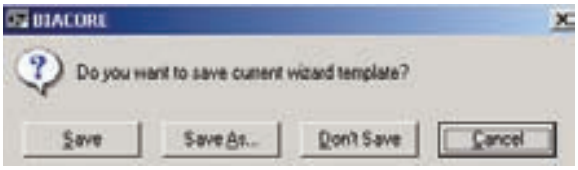
アナライトをセットし、**Next >**をクリックする。

↓



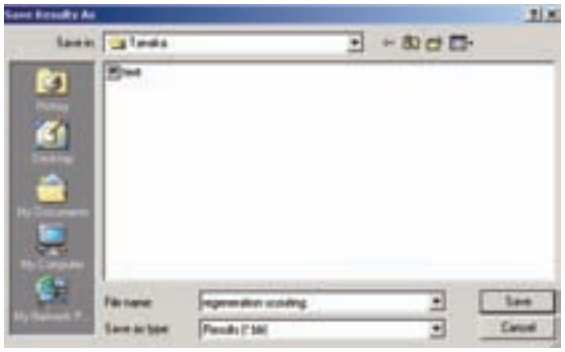
位置および容量を再確認し、**Standby Flow After Run** にチェックを入れる。必要があれば **Prime Before Run** にチェックを入れる。
Start をクリックする。

↓



作成したウィザードプログラムをテンプレートとして保存するかどうか、メッセージが表示される。通常は、**Don't Save** をクリックする。（結果ファイルに保存される。補足 11 参照。）

↓

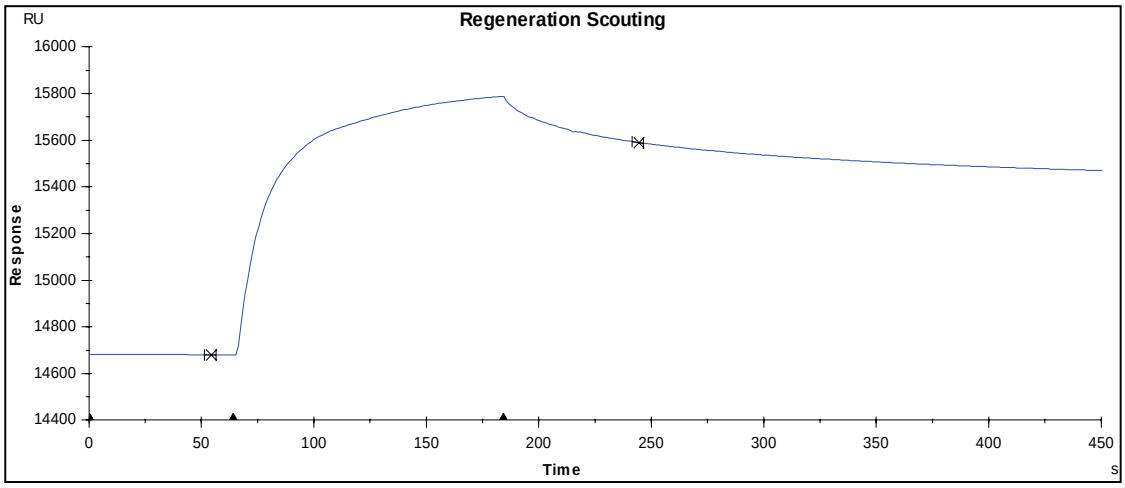


保存先のフォルダを開き、ファイル名を入力する。
Save をクリックする。

↓

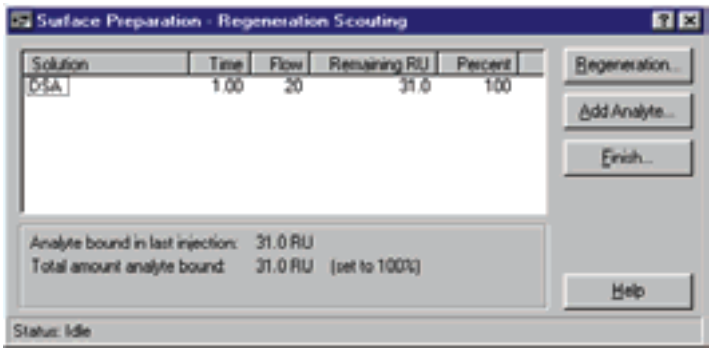
測定が開始する。
緊急停止したい場合は、キーボードの **Ctrl（左下）＋ Break（右上）**を同時に押す。

↓



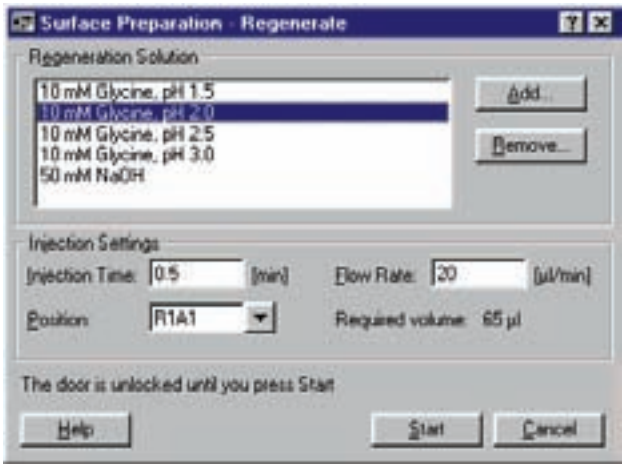
センサーグラムがスタートし、アナライトが添加される。

↓

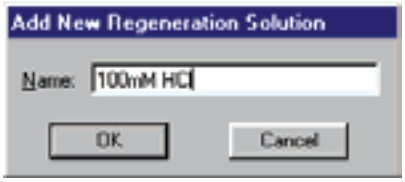


上のボックスが開き、上記のセンサーグラムのようにアナライトが解離していないときには、**Regeneration...**をクリックする。
（アナライトの結合量が少ない場合には、**Add Analyte...**をクリックすると、アナライトを再度添加できる。）

↓

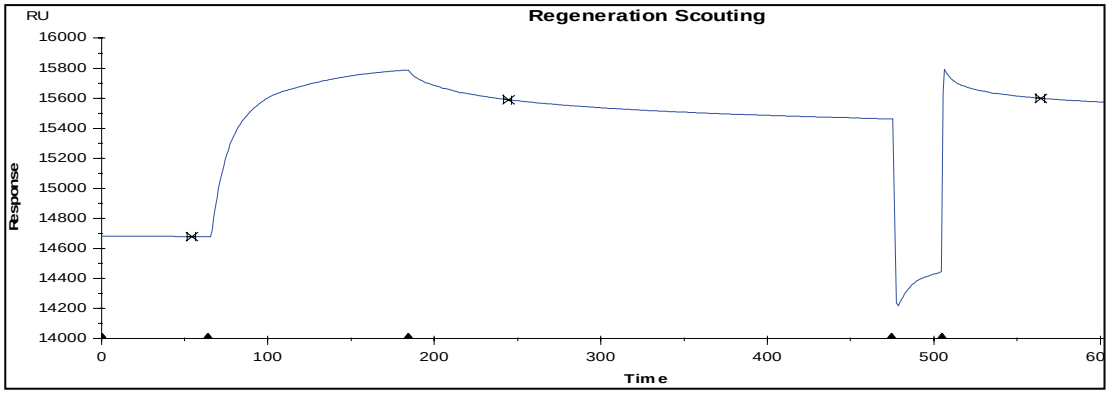


使用する再生溶液を選択し、添加時間、流速、バイアル位置を設定する。
再生溶液の 1 回の添加は 0.5～1 分間程度を推奨する。また、流速は速いほうが再生効果を得やすいことが多く、20～60 µl/min 程度がよく使われる。
ボックスの中に、使用したい再生溶液がない場合には、**Add...**をクリックして溶液名を入力し再生溶液を追加する。



設定後、**Start** をクリックする。

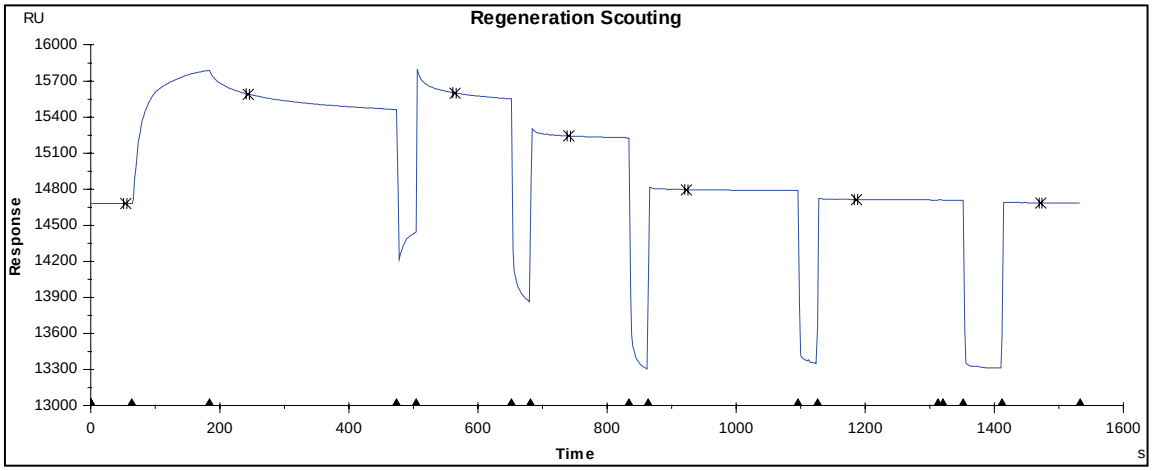
↓



選択した再生溶液が添加される。

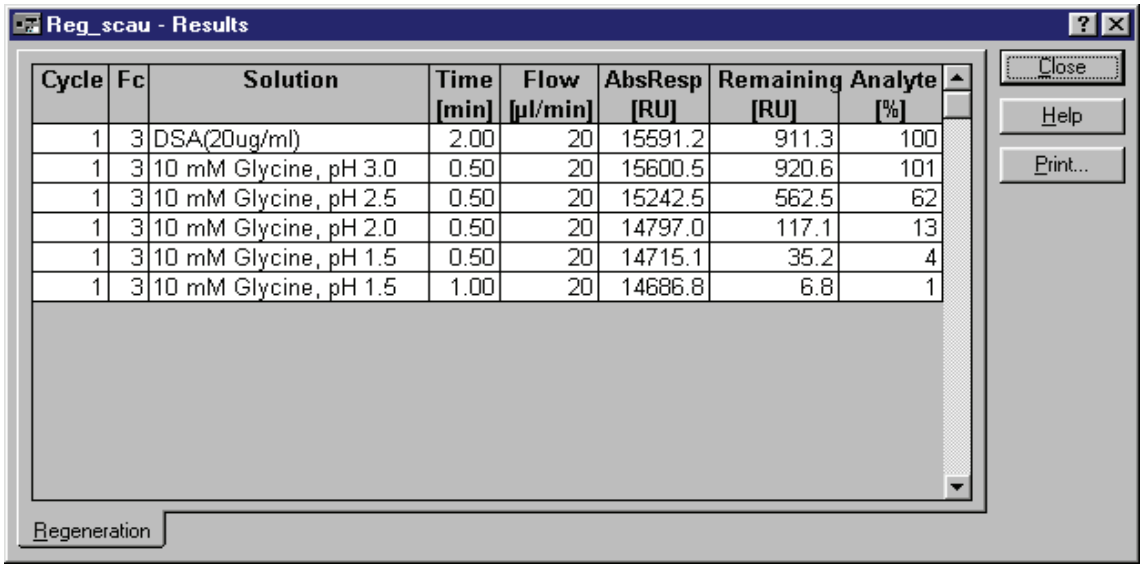
さらに、異なる再生溶液を試みる場合には、**Regeneration...**をクリックし、同様の操作をおこなう。アナライト添加開始前のベースライン付近まで解離する条件（再生溶液の種類、添加条件）を検索する。

↓



終了する場合には、Regeneration Scouting ボックスの **Finish...**をクリックする。

↓



Cycle	Fc	Solution	Time [min]	Flow [µl/min]	AbsResp [RU]	Remaining [RU]	Analyte [%]
1	3	DSA(20ug/ml)	2.00	20	15591.2	911.3	100
1	3	10 mM Glycine, pH 3.0	0.50	20	15600.5	920.6	101
1	3	10 mM Glycine, pH 2.5	0.50	20	15242.5	562.5	62
1	3	10 mM Glycine, pH 2.0	0.50	20	14797.0	117.1	13
1	3	10 mM Glycine, pH 1.5	0.50	20	14715.1	35.2	4
1	3	10 mM Glycine, pH 1.5	1.00	20	14686.8	6.8	1

Analyte が 80%以上残る場合（再生効率が 20%よりも少ない）

再生溶液の条件を厳しくする。（pH 条件を厳しくする、イオン強度を上げる等）

Analyte が 80～20%残る場合（再生効率が 20～80%）

繰り返し同じ再生溶液を 2 回添加してみる。

ほとんど再生される場合（再生効率が 90%もしくはそれ以上）

その再生条件を採用する。

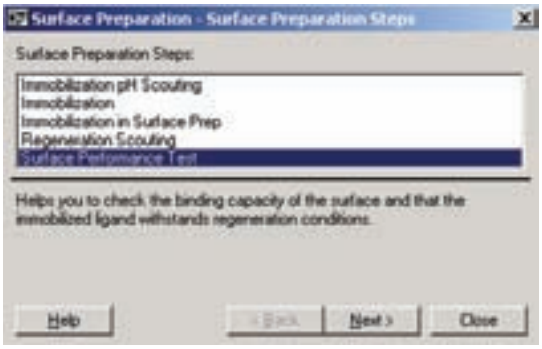
4-2. リガンドの安定性試験

スクリーニングや濃度測定など多サンプルを測定する場合には、再生によるリガンドの安定性確認が必要である。**Surface Preparation ウィザード**を利用すると、あらかじめ検討した再生条件で、繰り返し測定を実施し、リガンドの安定性を評価することができる。
リガンドの安定性の評価では、以下の点が重要となる。

- 同一濃度のアナライトの結合レスポンスが、各サイクルで変化がない。
  （リガンドが失活していない）。
- ベースラインが各サイクルで変化しない。

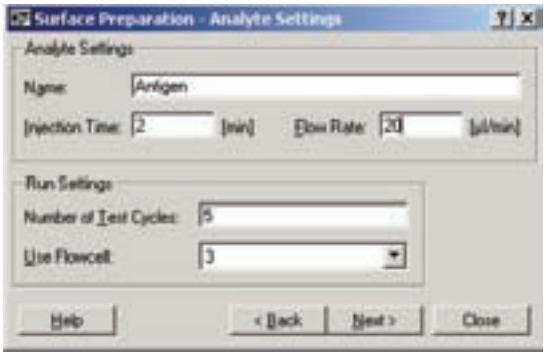
Run → **Run Application Wizard...** → **Surface Preparation** を選択し、**Start...**をクリックする。

↓


Surface Preparation - Surface Preparation Steps
Surface Preparation Steps:
Immobilization pH Scouting
Immobilization
Immobilization in Surface Prep
Regeneration Scouting
Surface Performance Test
Helps you to check the binding capacity of the surface and that the immobilized ligand withstands regeneration conditions.
Help
< Back
Next >
Close

Surface Performance Test を選択し、**Next** >をクリックする。

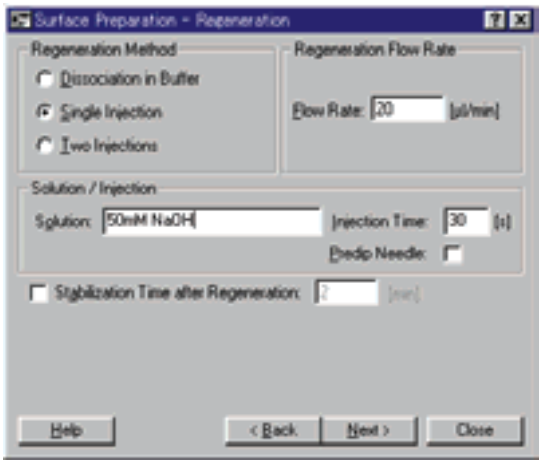
↓



Name	アナライト名	
Injection Time	添加時間	
Flow Rate	流速	
Number of Test Cycles	繰り返し測定回数	5 回以上
Use Flowcell	使用するフローセル	

Next >をクリックする。

↓

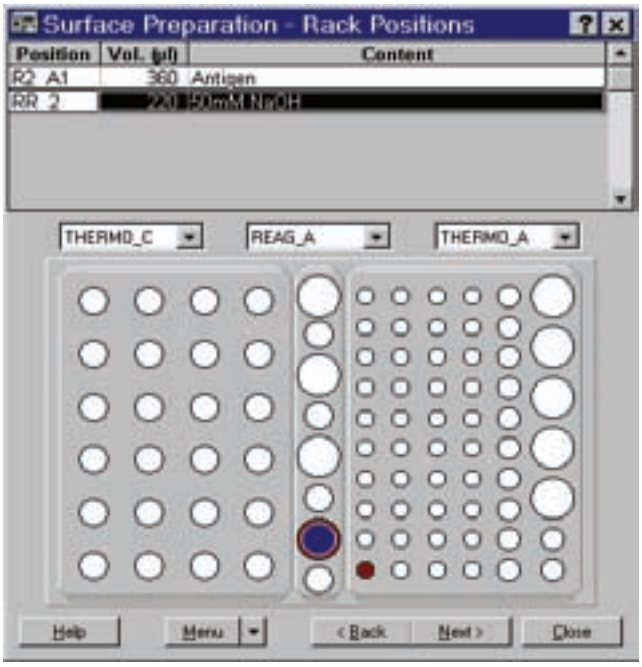


Regeneration Method

Dissociation in Buffer	アナライトを自然解離させる。 （解離速度が非常に速いアナライトの場合）
Single Injection	再生溶液を 1 回添加する。
Two Injections	再生溶液を 2 回もしくは 2 種類添加する。
Solution	再生溶液名
Injection Time	添加時間

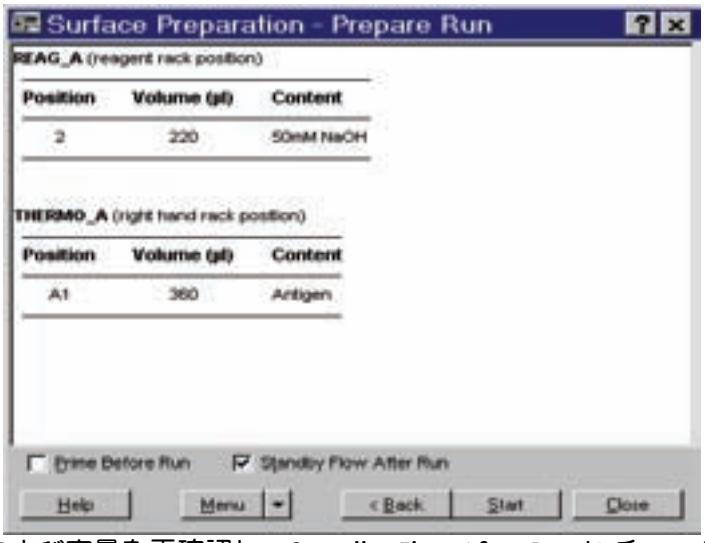
Next >をクリックする。

↓



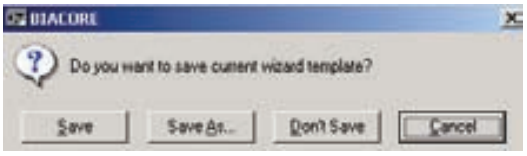
サンプルおよび試薬をセットし、**Next** >をクリックする。

↓



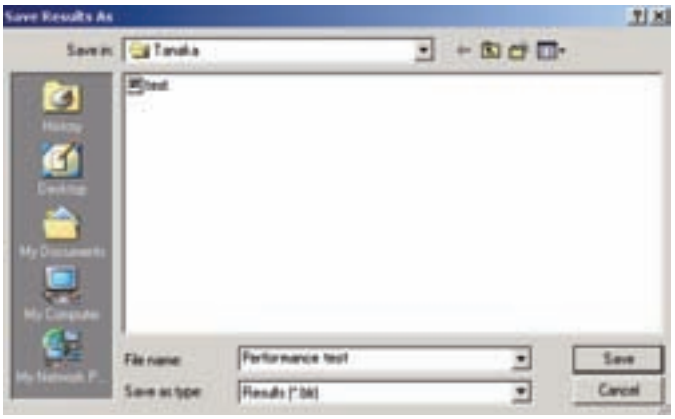
サンプルの位置および容量を再確認し、**Standby Flow After Run** にチェックを入れる。必要があれば **Prime Before Run** にチェックを入れる。
Start をクリックする。

↓



作成したウィザードプログラムをテンプレートとして保存するかどうか、メッセージが表示される。通常は、**Don't Save** をクリックする。（結果ファイルに保存される。補足 11 参照。）

↓



保存先のフォルダを指定し、ファイル名を入力し、**Save** をクリックする。

↓

測定が開始する。
緊急停止したい場合は、キーボードの **Ctrl（左下）＋ Break（右上）**を同時に押す。

↓

Baseline Level 各サイクルのベースラインレベル

Response Level 各サイクルの同一濃度アナライトの結合レスポンス

サイクルごとにはっきりとした傾向がなく、変動の幅が小さい場合は非常に良好な結果である。レスポンスの変動がなく一定の場合には、ベースラインが幾分か減少しても良い。

Baseline Level 低下および Response Level 低下の場合

再生によりリガンドが遊離している。弱めの再生条件に変更する。

Baseline Level 不変および Response Level 低下の場合

再生によりリガンドが失活している。弱めの再生条件に変更する。

Baseline Level 上昇および Response Level 低下の場合

アナライトが完全に遊離していない。強めの再生条件に変更する。

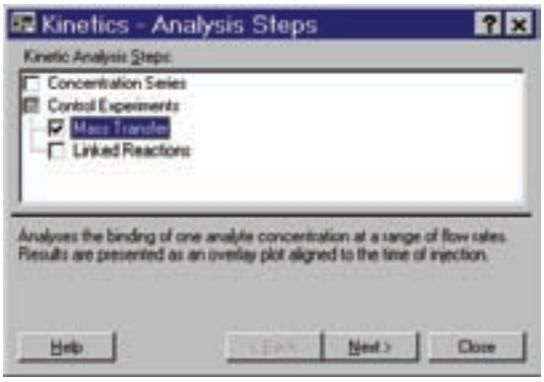
4-3. 反応速度定数算出のための実験系の評価

4-3-1. 固定化量の評価

Mass Transfer ウィザードを利用すると、マストランスポートリミテーションの影響が現れているか調べることができる。
マストランスポートリミテーションとは、リガンドの固定化量が多すぎるときに発生する現象である。結合領域において、センサー表面デキストラン内のアナライトの濃度が低くなり、また、解離領域においては、一度解離したアナライトが、さらにリガンドに再結合する（rebinding)。そのような環境下で取得したセンサーグラムからは、真の反応速度定数の算出はできない。このウィザードでは、同一アナライトを同一濃度で、流速を変化させて添加し、結合量の違いを評価する。マストランスポートリミテーション下では、流速ごとに結合レスポンスに変化が生じる。この場合には、固定化量を減少させて実験をやり直すか、解析ソフトウェアでの解析の際に、1:1(Langmuir) with mass transfer モデルを選択する必要がある。

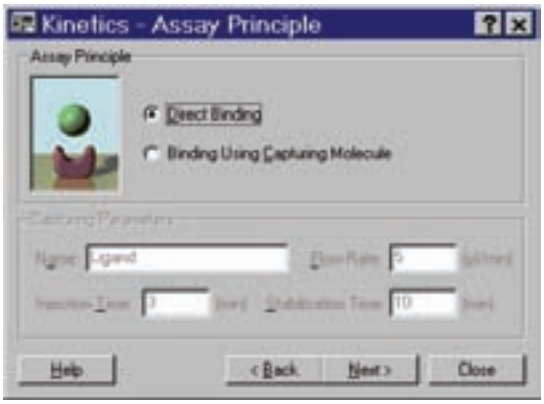
Run → **Run Application Wizard...**をクリックし、**Kinetic Analysis** を選択する。

↓



Mass Transfer を選択し、**Next** >をクリックする。

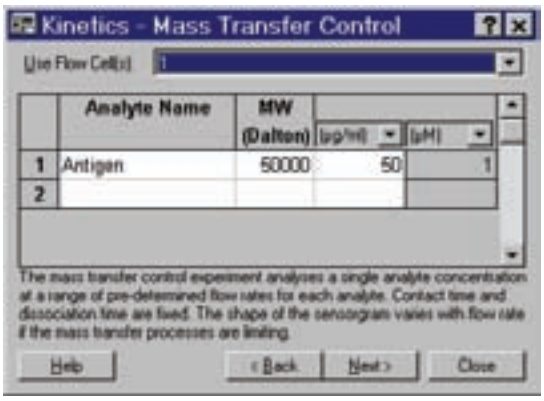
↓



Direct Binding を選択する。キャプチャー法によりリガンドをトラップ後、アナライトとの相互作用測定をおこなう場合は、**Binding Using Capturing Molecule** を選択する。

Next >をクリックする。

↓


Kinetics - Mass Transfer Control
Use Flow Cell(s)
Analyte Name
MW (Dalton)
1
Antigen
50000
50
1
2
The mass transfer control experiment analyses a single analyte concentration at a range of pre-determined flow rates for each analyte. Contact time and dissociation time are fixed. The shape of the sensorgram varies with flow rate if the mass transfer processes are limiting.
Help
< Back
Next >
Close

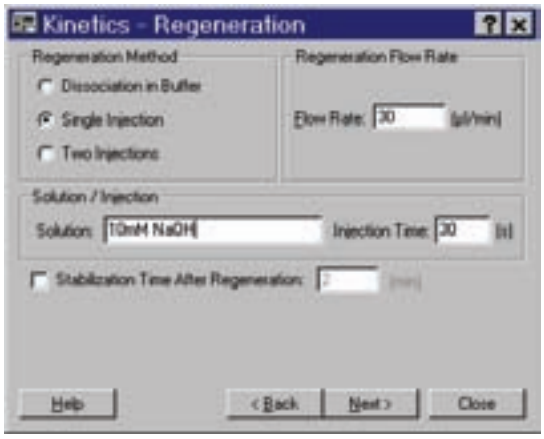
Use Flow Cell(s) 使用するフローセル（リガンド固定化セルからリファレンスセルを差し引きする設定が望ましい。）

Analyte Name アナライト名

MW アナライトの分子量

Next >をクリックする。

↓



Regeneration Method

Dissociation in Buffer アナライトを自然解離させる。（解離速度が非常に速いアナライトの場合）

Single Injection 再生溶液を 1 回添加する。

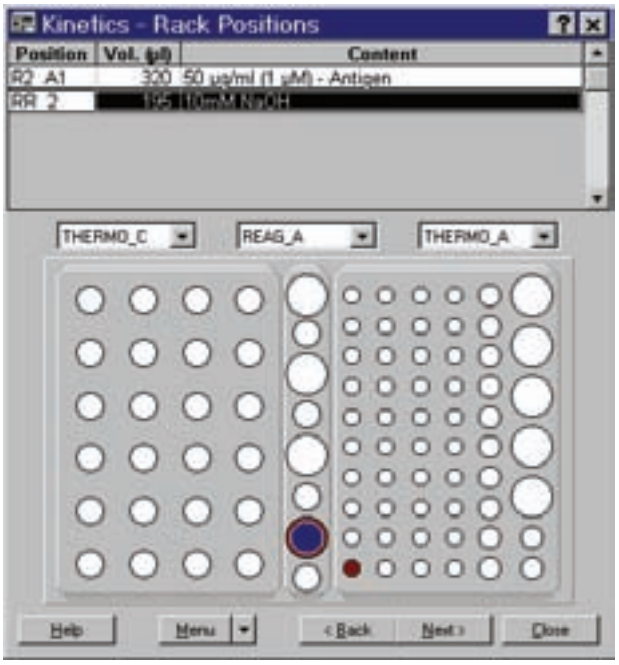
Two Injections 再生溶液を 2 回もしくは 2 種類添加する。

Solution 再生溶液名

Injection Time 添加時間

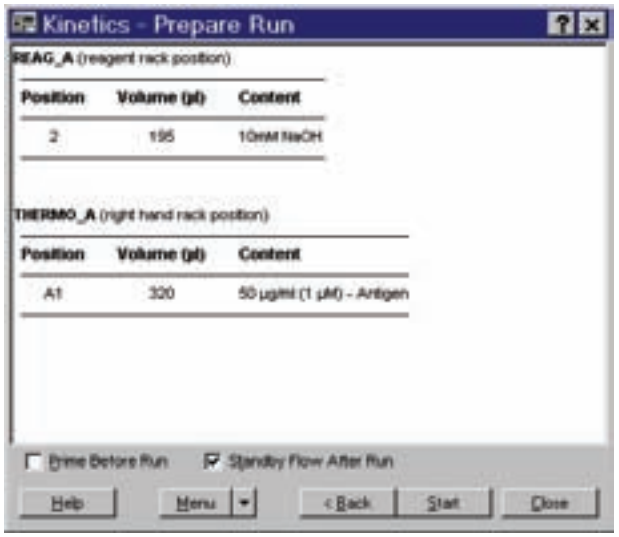
Next >クリックする。

↓



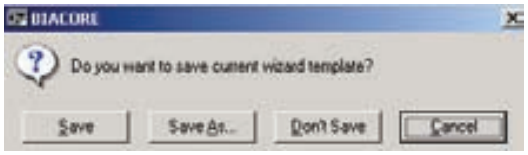
サンプルおよび試薬をセットし、**Next >**クリックする。

↓



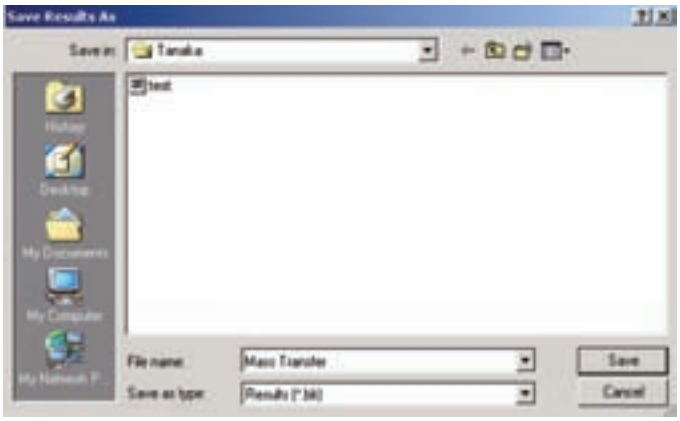
サンプルの位置および容量を再確認し、**Standby Flow After Run** にチェックを入れる。必要があれば **Prime Before Run** にチェックを入れる。**Start** をクリックする。

↓



作成したウィザードプログラムをテンプレートとして保存するかどうか、メッセージが表示される。通常は、**Don't Save** をクリックする。

↓

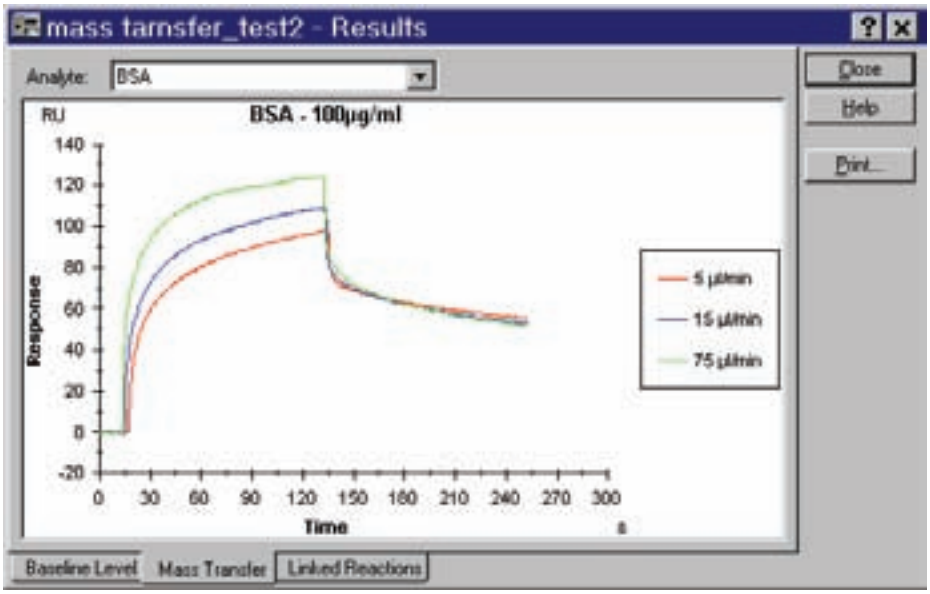


保存先のフォルダを指定し、ファイル名を入力する。
Save をクリックする。

↓

測定が開始する。
緊急停止したい場合は、キーボードの **Ctrl（左下）＋ Break（右上）**を同時に押す。

↓



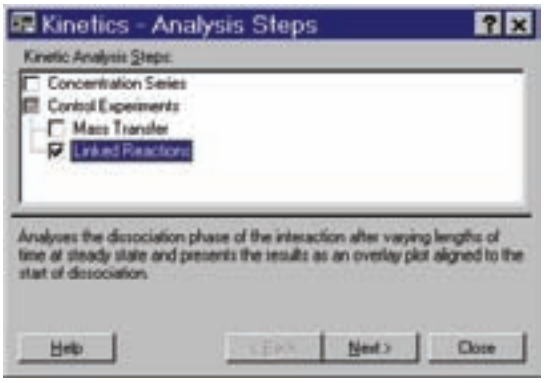
理想的な実験条件では、固定化したリガンドと添加したアナライトとの間の相互作用（結合および解離両速度）に、流速は影響しない。
マストランスポートリミテーション条件下では、相互作用反応は流速によって大きく変化する。表示された重ね書きのセンサーグラムの結合レスポンスに違いがあれば、マストランスポートリミテーション条件下である。
この場合には、リガンドの固定化量を減少させて実験をやり直すか、解析ソフトウェアでの解析の際に、**1:1(Langmuir) with mass transfer** モデルを選択する。

4-3-2. 結合様式の評価

Linked Reaction ウィザードを利用すると、リガンドとアナライトの反応が、1:1 モデルか、あるいはより複雑な反応モデルかを検討することができる。
同一アナライトを同一濃度（平衡に達するに十分な濃度）で、添加時間を変えて添加し、解離領域のセンサーグラムを評価する。
1:1 モデルの反応の場合、アナライトの添加時間が依存せず、解離速度は一定である。複雑な反応モデルの場合、添加時間に依存して、解離速度が変化する。解析の際の参考情報となる。

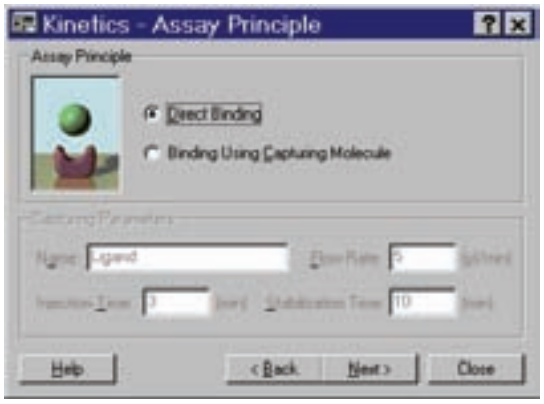
Run → **Run Application Wizard...**をクリックし、**Kinetic Analysis** を選択する。

↓


Kinetics - Analysis Steps
Kinetic Analysis Steps:
Concentration Series
Control Experiments
Mass Transfer
Linked Reactions
Analyses the dissociation phase of the interaction after varying lengths of time at steady state and presents the results as an overlay plot aligned to the start of dissociation.
Help
Next >
Close

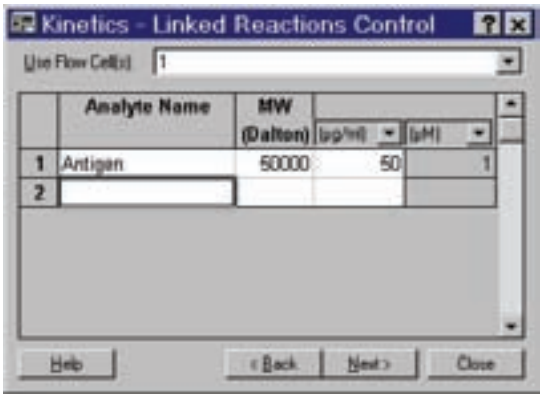
Linked Reaction を選択し、**Next** >をクリックする。

↓



Direct Binding を選択する。キャプチャー法によりリガンドをトラップ後、アナライトとの相互作用測定をおこなう場合には、**Binding Using Capturing Molecule** を選択する。
Next >をクリックする。

↓



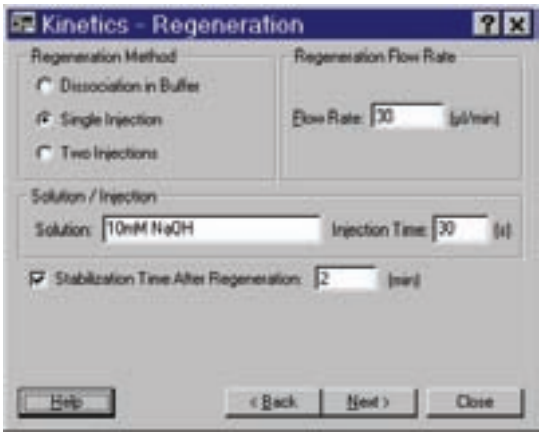
Use Flow Cell(s) 使用するフローセル（リガンド固定化セルからリファレンスセルを差し引きする設定が望ましい。）

Analyte Name アナライト名

MW アナライトの分子量

Next >をクリックする。

↓



Regeneration Method

Dissociation in Buffer アナライトを自然解離させる。（解離速度が非常に速いアナライトの場合）

Single Injection 再生溶液を 1 回添加する。

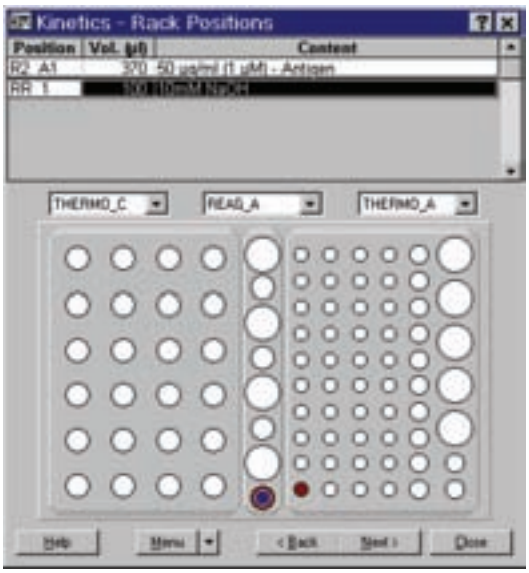
Two Injections 再生溶液を 2 回もしくは 2 種類添加する。

Solution 再生溶液名

Injection Time 添加時間

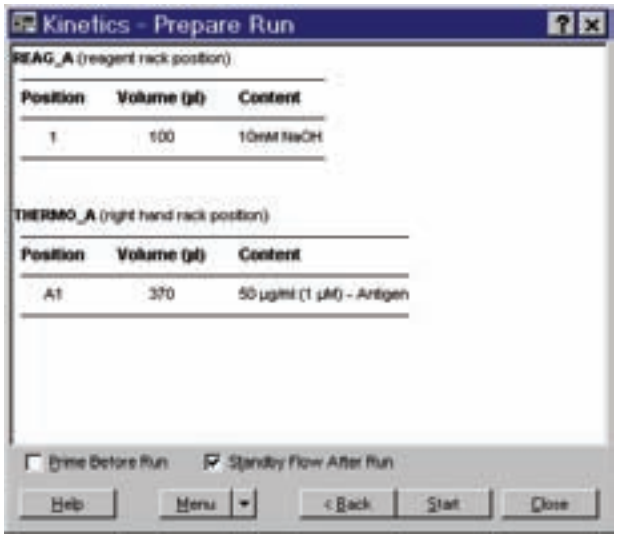
Next >をクリックする。

↓



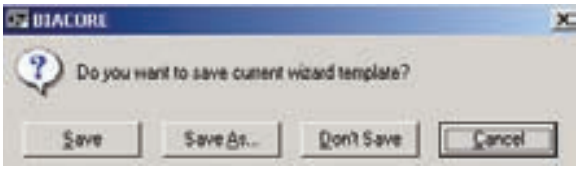
サンプルおよび試薬をセットし、**Next >**をクリックする。

↓



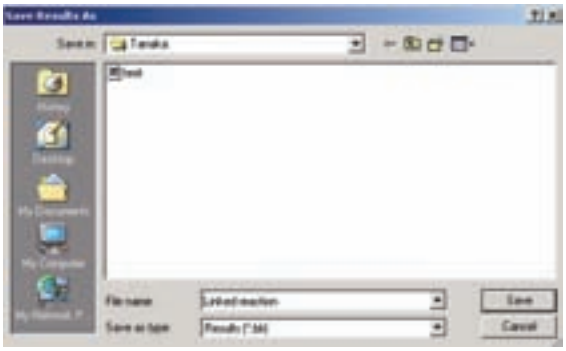
サンプルの位置および容量を再確認し、**Standby Flow After Run** にチェックを入れる。必要があれば **Prime Before Run** にチェックを入れる。**Start** をクリックする。

↓



作成したウィザードプログラムをテンプレートとして保存するかどうか、メッセージが表示される。通常は、**Don't Save** をクリックする。（結果ファイルに保存される。補足 11 参照。）

↓



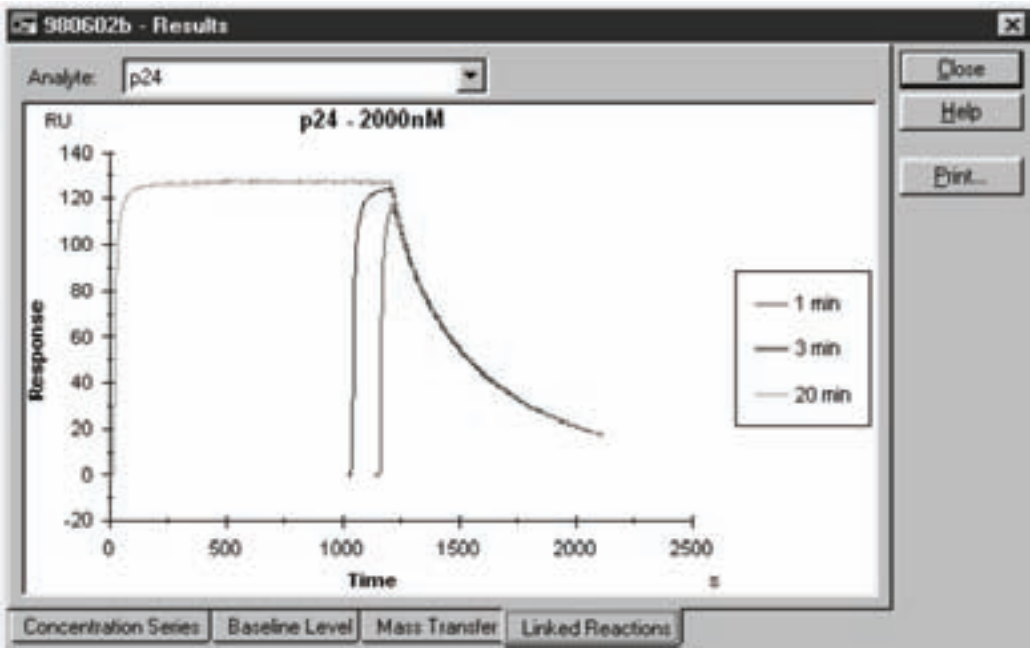
保存先のフォルダを指定して、ファイル名を入力し、**Save** をクリックする。

↓

測定が開始する。

緊急停止したい場合は、キーボードの **Ctrl（左下）＋ Break（右上）**を同時に押す。

↓



相互作用が 1:1 モデルの場合、サンプルの添加時間に関係なく、解離速度は一定となる。解離に差がある場合には反応は 1:1 モデルではなく、複雑な反応モデルであることが考えられる。このような場合に 1:1 binding モデルで解析をおこなうと、本来の速度定数と異なる値が算出される可能性がある。

5. 相互作用測定

マニュアル操作による特異的結合の確認と再生条件の検討により実験条件を決定したら、実験目的に応じたウィザードで測定を実施する。あらかじめ目的別に測定の流れが決まっているウィザードを利用することができる。なお、自由にプログラムを組み立てたい場合には、Customized Application ウィザードを利用する（5-3、5-4 章参照）。

反応速度定数および解離定数の算出	Kinetics Analysis	5-1 章
結合確認	Binding Analysis	5-2 章
スクリーニング	Customized Application	5-3 章
濃度測定	Customized Application	5-4 章

5-1. 反応速度定数・解離定数の算出

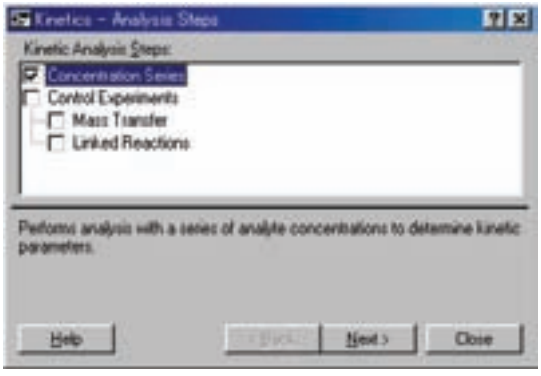
Run → Run Application Wizard...をクリックする。

↓

Run Application Wizard
Surface Preparation
Analyte Recovery
Binding Analysis
Kinetic Analysis
Customized Application
Start...
Use Template...
Cancel
The kinetic analysis wizard guides you through the steps in determining kinetic parameters for an interaction, helps you to design and perform crucial control experiments, and gives immediate feedback in the form of apparent rate constants (based on a 1:1 interaction model).

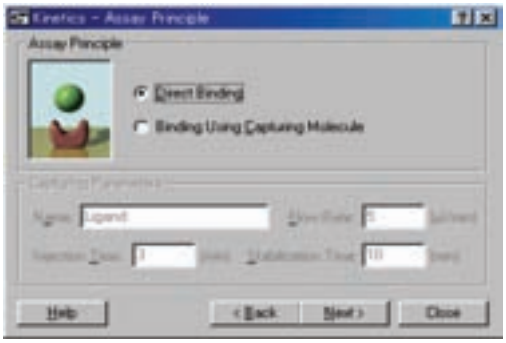
Kinetic Analysis を選択し、**Start...**をクリックする。

↓



Concentration Series を選択し、**Next >**をクリックする。

↓

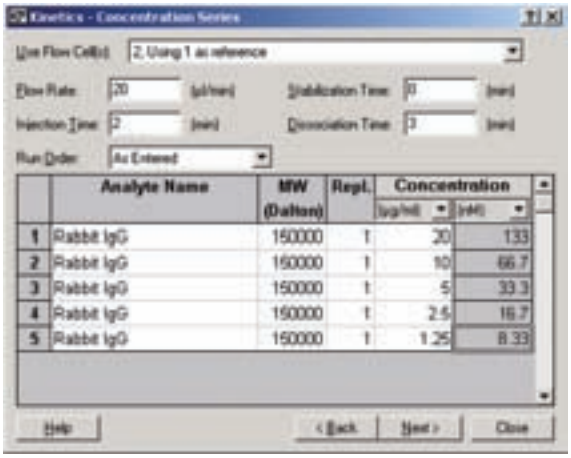


Direct Binding 直接固定化したリガンドとの相互作用測定

Binding Using Capturing Molecule
キャプチャー法でリガンドを固定化後、相互作用測定

ここでは **Direct Binding** を選択し、**Next** >をクリックする。

↓



Use Flow Cell(s) 使用するフローセルを選択する。

Flow Rate 流速 20 µl/min 以上

Injection Time 添加時間 2～3 min

Dissociation Time 解離時間 2～3 min

Stabilization Time アナライト添加前のベースラインの安定化時間である。再生後のベースラインの安定化に時間を要する場合に設定する。

Run Order 測定順序を選択する。

- **Random** 入力したサンプルをランダムに測定。
- **Sorted – Low to High** 濃度展開して添加する場合、低濃度側から測定。
- **As Entered** 入力した順番で測定。複数の繰り返し測定を指定する場合、同じサンプルについては連続して測定する。

Analyte Name アナライト名

MW アナライトの分子量

Repl. アナライトの繰り返し測定回数

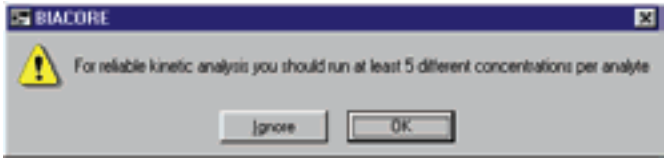
Concentration アナライト濃度。アナライト濃度は 5 段階以上、少なくと

も 1 濃度について繰り返し測定し、濃度 0 のアナライトにも測定することを推奨する。カラムを選択した状態で、Enter を繰り返し押すと、サンプル数を増やすことができる。

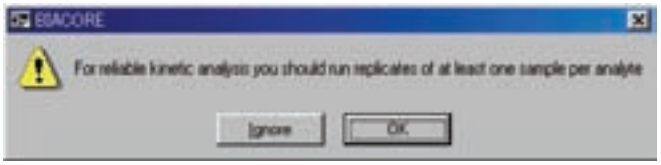
Next >をクリックする。

補足 28. サンプル情報入力後の注意事項

Next >をクリックしたあと、次のメッセージが出てくる場合がある。

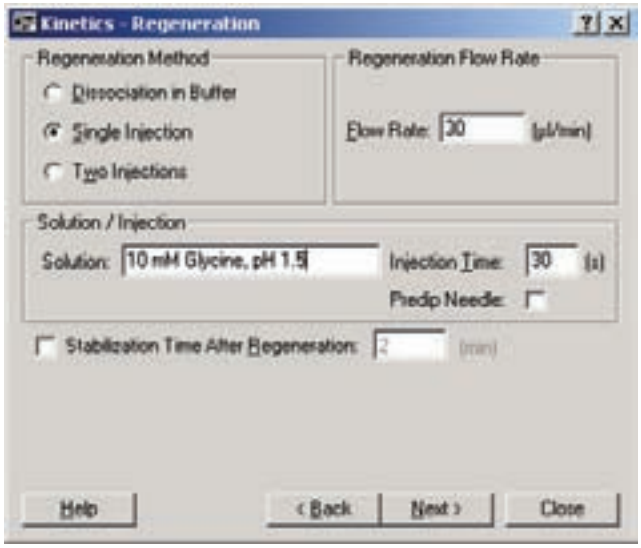


アナライトの濃度を 5 段階以上でおこなうことを奨めるものである。必要がない場合には、**Ignore** をクリックする。



アナライトの同一濃度のサンプルを複数回繰り返し測定することを奨めるものである。必要がない場合には、**Ignore** をクリックする。

↓

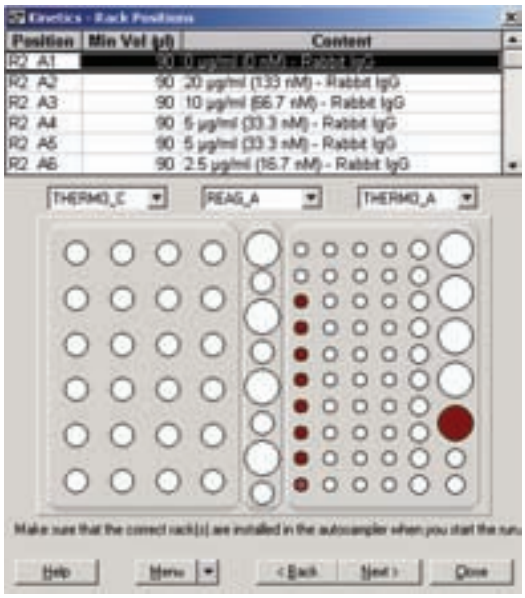


Regeneration Method

Dissociation in Buffer	アナライトを自然解離させる。 （解離速度が非常に速いアナライトの場合）
Single Injection	再生溶液を 1 回添加する。
Two Injections	再生溶液を 2 回もしくは 2 種類添加する。
Solution	再生溶液名
Injection Time	添加時間

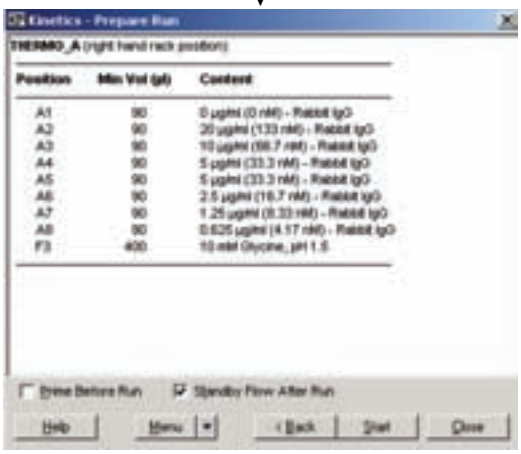
Next >をクリックする。

↓



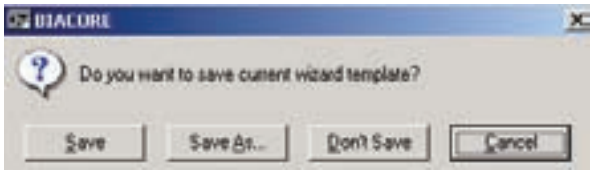
サンプルおよび試薬をセットし **Next >**をクリックする。

↓



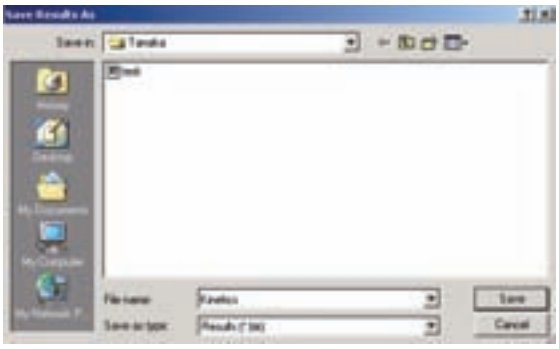
位置および容量を再確認し、**Standby Flow After Run** にチェックを入れる。必要があれば **Prime Before Run** にチェックを入れる。
Start をクリックする。

↓



作成したウィザードプログラムをテンプレートとして保存するかどうか、メッセージが表示される。通常は **Don't Save** をクリックする。(結果ファイルに保存される。補足 11 参照)

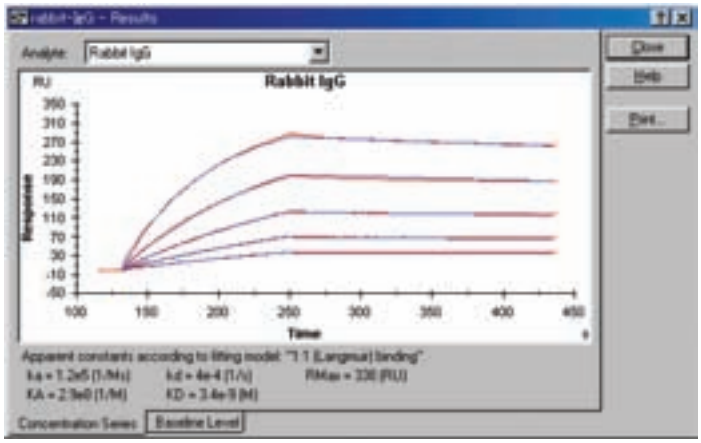
↓



保存先のフォルダを指定後、ファイル名を入力し、**Save** をクリックする。
測定が開始する。
緊急停止したい場合は、キーボードの **Ctrl（左下）＋ Break（右上）**を同時に押す。

↓

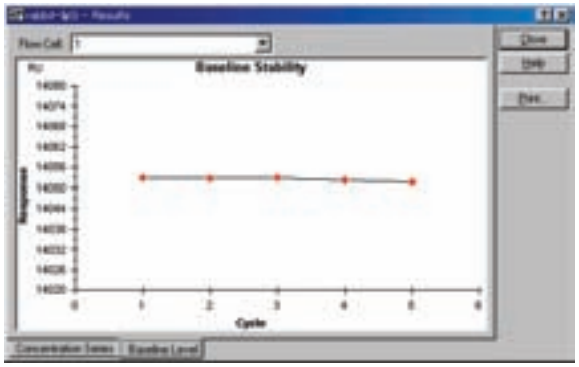
測定が終了すると、得られたセンサーグラムを、1:1 binding モデルでフィッティングし、反応速度定数を算出する。



k_a	結合速度定数（1/Ms）
k_d	解離速度定数（1/s）
K_A	親和定数（1/M）
K_D	解離定数（M）
Rmax	アナライトの最大結合量（RU）

1:1 binding モデル以外の反応モデルで解析したい場合は、解析ソフトウェアでファイルを開く。

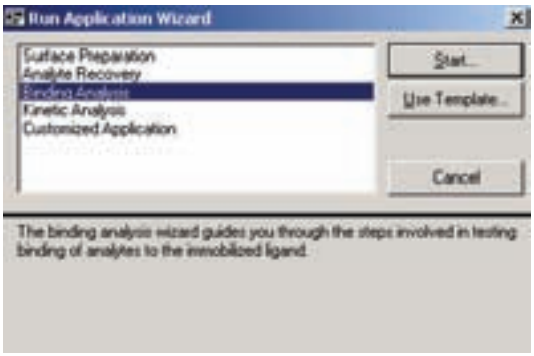
表中の **Baseline Level** をクリックすると各サンプルのベースラインの変動を表示することができる。



5-2. 特異的結合確認

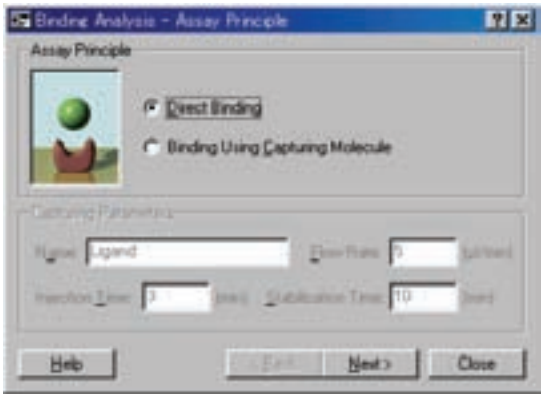
Run → **Application Wizard...**をクリックする。

↓



Binding Analysis を選択し、**Start...**をクリックする。

↓



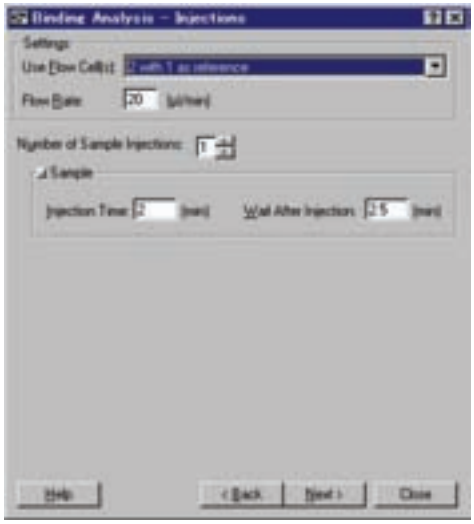
Direct Binding あらかじめリガンドを固定化している場合に選択。

Binding Using Capturing Molecule

キャプチャー法を利用する場合に選択。

ここでは、**Direct Binding** を選択する。**Next >**をクリックする。

↓



Use Flow Cell(s)　使用するフローセルを選択。（リガンド固定化セルからリファレンスセルを差し引きする設定が望ましい。）

Flow Rate　流速を設定する。10～20 µl/min 程度

Number of Sample Injections

アナライト添加回数（同一サイクル内のアナライト添加回数。補足 29 参照。）

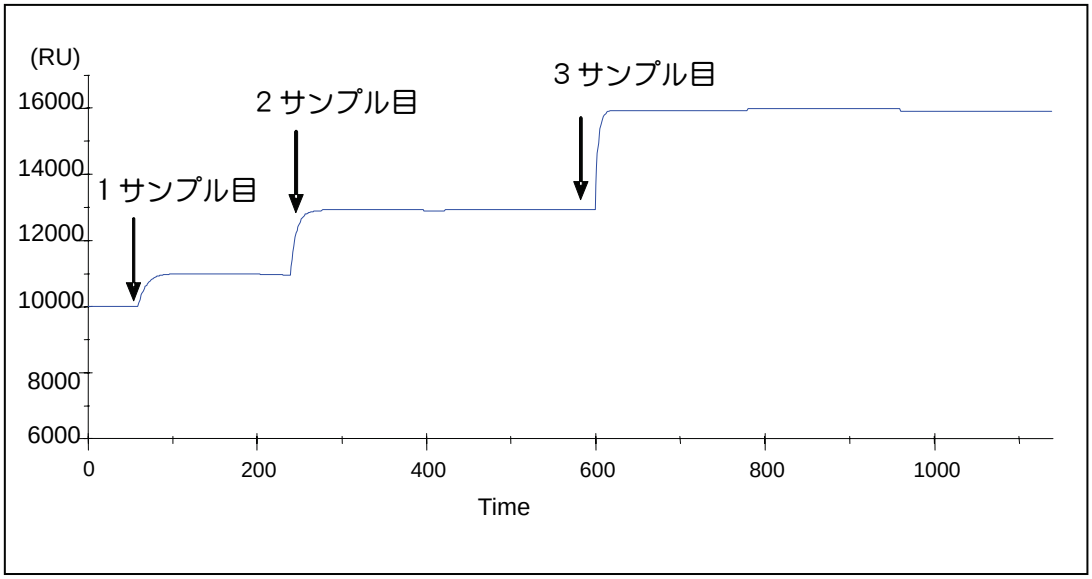
Injection Time　添加時間　0.5～3 min

Wait After Injection　解離時間　通常、2.5 min

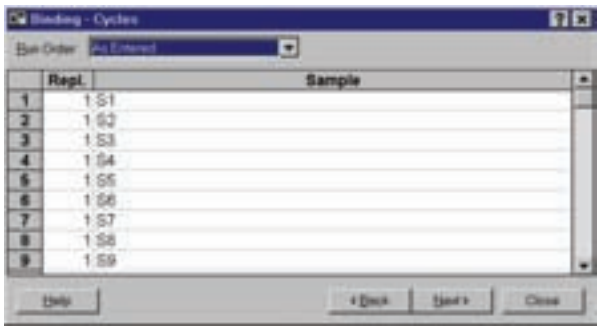
Next>をクリックする。

補足 29. 複数のアナライトの連続添加

エピトープマッピング等、多段階の反応を見る場合には、**Number of Sample Injections** でアナライト数を選択する。最大 4 サンプルまでの添加が可能である。



↓



Sample アナライト名（同一サンプル名を複数入力すると、同一バイアルに設定される。別々のバイアルに設定したい場合には、サンプル名を変える。S1-1、S1-2 など。）

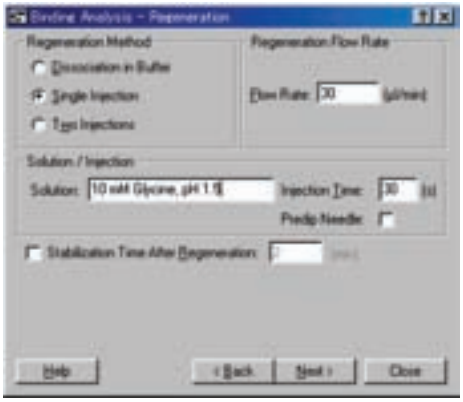
Repl. 同一アナライトの繰り返し測定回数を入力する。

Run Order 測定順序を選択する。

- **Random** 入力したサンプルをランダムに測定。
- **As Entered** 入力した順番で測定。複数の繰り返し測定を指定している場合、同じサンプルについては連続して測定する。
- **Step** 複数の繰り返し測定を指定している場合、全ファイルにおいて、一連の測定終了後、二連目を測定。

Next >をクリックする。

↓



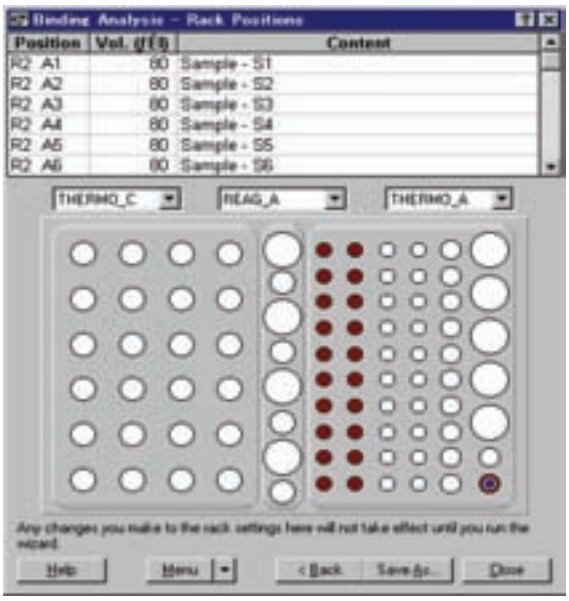
Regeneration Method

- **Dissociation in Buffer** アナライトを自然解離させる。（解離速度が非常に速いアナライトの場合）
- **Single Injection** 再生溶液を 1 回添加する。
- **Two Injections** 再生溶液を 2 回もしくは 2 種類添加する。

再生溶液名と添加時間を設定する。

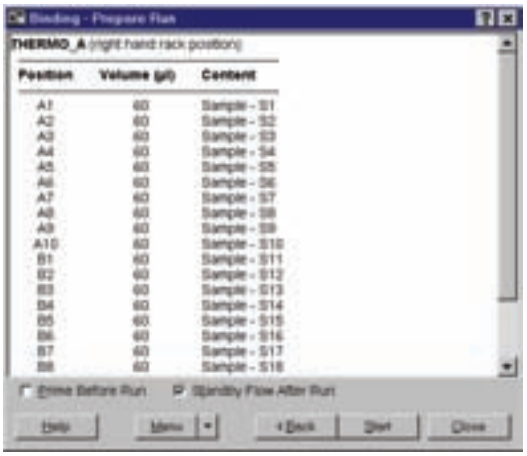
Next >をクリックする。

↓



サンプルおよび試薬をセットし、**Next >**をクリックする。

↓

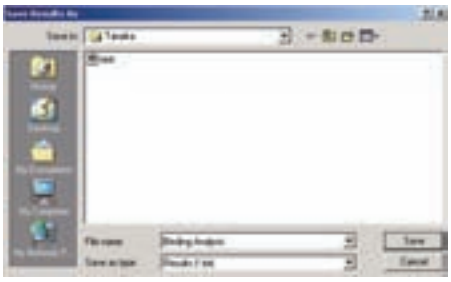


サンプルの位置および容量を再確認し、**Standby Flow After Run** にチェックを入れる。必要があれば **Prime Before Run** にチェックを入れる。**Start** をクリックする。

↓

作成したウィザードプログラムをテンプレートとして保存するかどうか、メッセージが表示される。通常は、**Don't Save** をクリックする。(結果ファイルに保存される。補足 11 参照。)

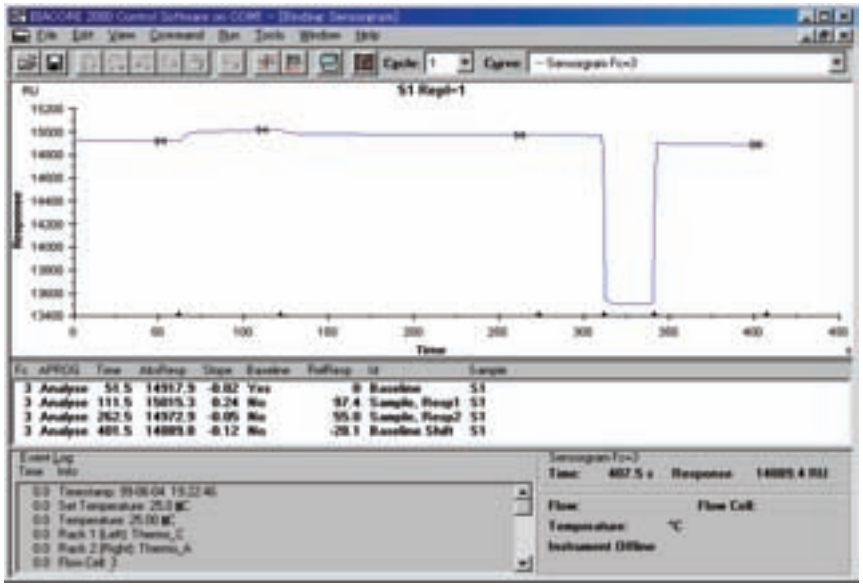
↓



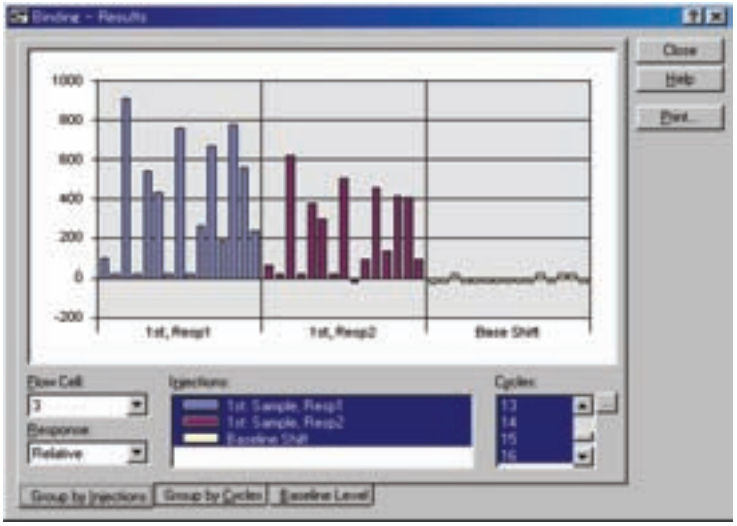
保存先のフォルダを指定し、ファイル名を入力後、**Save** をクリックする。
測定が開始する。
緊急停止したい場合は、キーボードの **Ctrl（左下）＋ Break（右上）**を同時に押す。

↓

測定が終了すると、以下のような実験結果が表示される。



結合レスポンスのグラフが表示される。



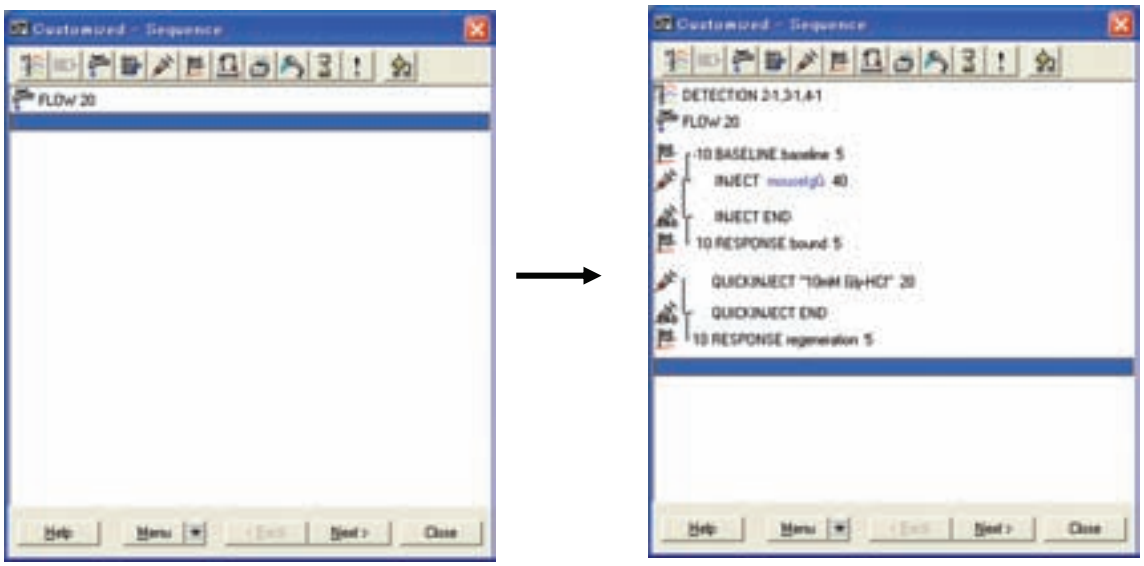
Resp1 は、アナライト添加終了直前のレスポンス、Resp2 はサンプル添加後（再生溶液添加前）のレスポンスである。

5-3. スクリーニング

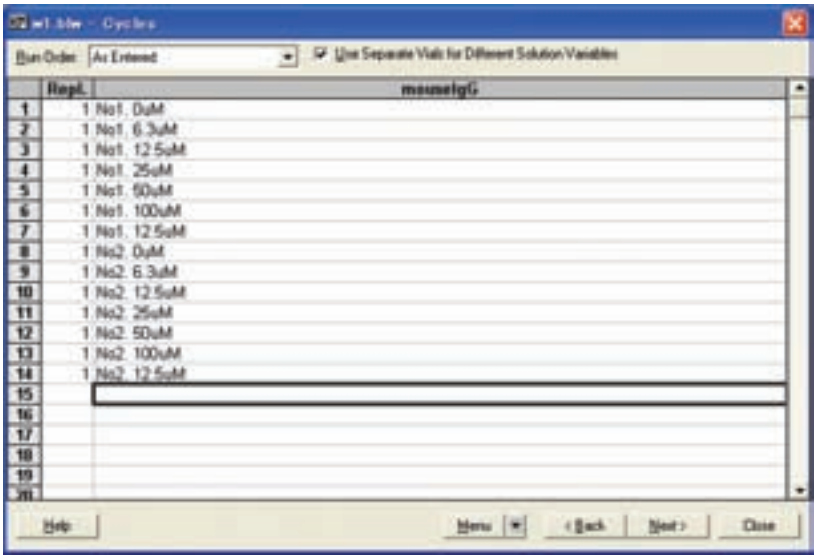
スクリーニングのプログラム作成は、**Customized Application ウィザード**でおこなう。このウィザードは、プログラムを 1 から自由に組み立てることができる。複数セルを利用した相互作用測定や多段階反応、濃度測定などの複雑な実験系を構築する場合に有効である。さらに、自動判断機能である、If / Then コマンド（5-3-2 章参照）を利用することで、再生操作の有無をベースラインの変動から判断するなど、詳細な条件設定が可能となる。

プログラム作成の流れ

① Sequence ウインドウで、各種アイコン（補足 30 参照）をクリックして測定の流れを決定する。



② Cycle ウインドウで、サンプル情報の入力と測定順番を指定する。



補足 30. アイコンの説明

	検出モード	検出セルと測定温度を設定。
	キーワードの設定	レポートポイントテーブル中にサンプル名、濃度等の任意のサンプル情報を表示させるコマンド。補足 36 参照。
	流速の設定	流速を設定。
	サンプル、試薬の添加	添加モード、容量を設定。試料添加における洗浄機能の設定も可能。
	レポートポイントの記録	レポートポイントの設定。
	サンプルの移動	試料をバイアル間で移動させるコマンド。 自動で、試料の混合や希釈をおこなう場合に設定。
	サンプルの攪拌	バイアル中の試料を攪拌するコマンド。通常はサンプル移動コマンドとセットで使用。
	流路の洗浄	ニードルや IFC をランニング緩衝液で洗浄するコマンド。
	添加の待機	ランニング緩衝液を流した状態で、次のコマンド実行を設定時間待機させるコマンド。
	コメントの入力	プログラム画面中にコメントを入力するコマンド。操作に影響はない。
	If/Then 機能	レポートポイントを基準値として、プログラム実行を自動判断するコマンド。5-3-2 章および補足 35 参照。

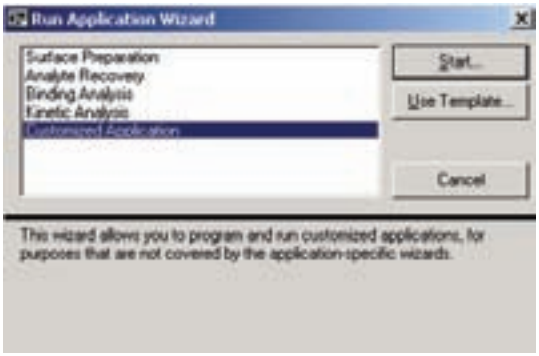
5-3-1. 基本プログラム

抗体のスクリーニングを例に複数セルを用いたプログラム作成について紹介する。

リガンド	抗原 1	Fc2
	抗原 2	Fc3
	抗原 3	Fc4
アナライト	抗体 No.1～No.96（96 サンプル）	
リファレンスセル	Fc1	

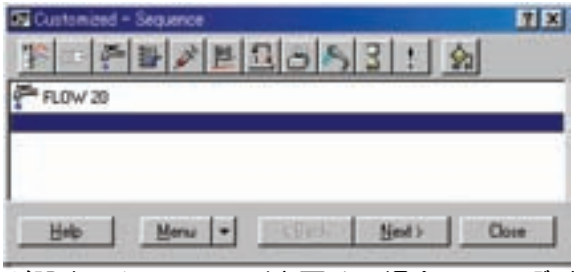
Run → **Run Application Wizard...**をクリックする。

↓



Customized Application を指定し、**Start...**をクリックする。

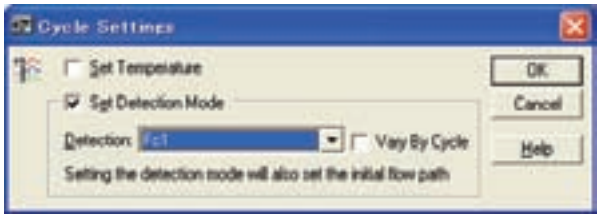
↓



あらかじめ、**FLOW 20** が設定されている。（変更する場合には、ダブルクリックする。）

↓

上記ツールバーの をクリックする。

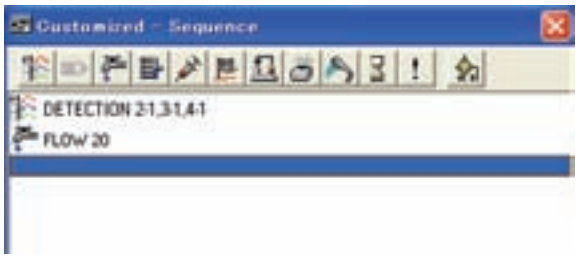


Detection を選択する。

ここでは、Fc1,2,3,4　Ref 2-1,3-1, 4-1 を選択する。

OK をクリックする。

↓



FLOW 20 の下段をクリックし、ハイライトにする。

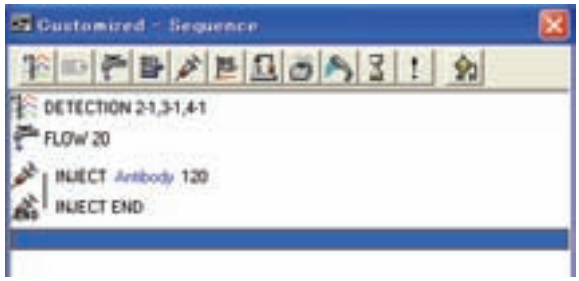
をクリックして、アナライトの添加を設定する。

Injection Mode　　INJECT を選択する。

Solution　　Vary by Cycle にチェックを入れる。サイクルごとにアナライトを変更できる。カラムにサンプル名を入力する。

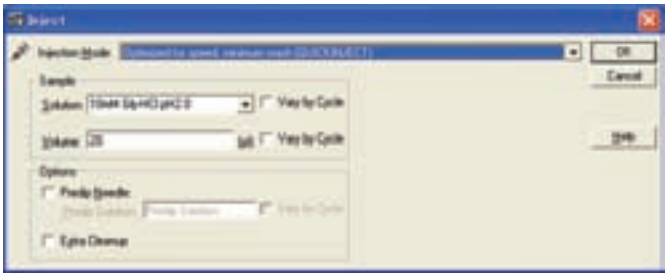
Volume　　添加容量を入力する。

OK をクリックする。



↓

引き続き、 をクリックして、再生溶液の添加を設定する。

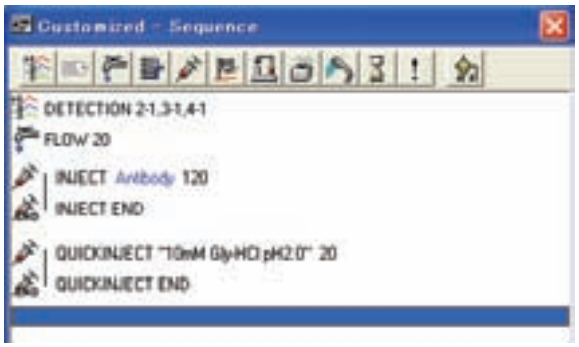


Injection Mode:　　QUICKINJECT を選択する。

Solution　　Vary by Cycle のチェックははずす。再生溶液名を入力する。

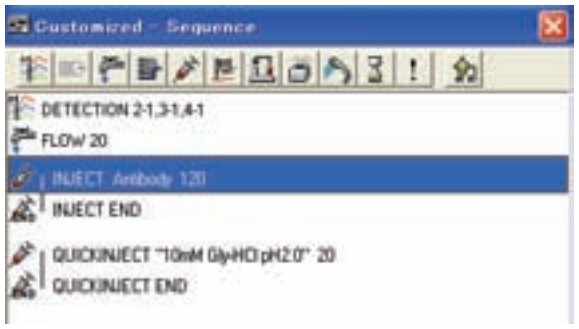
Volume　　添加容量を入力する。

OK をクリックする。

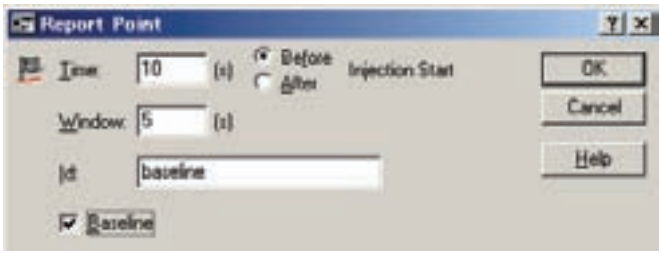


↓

引き続き、レポートポイントを設定する。



アナライト添加コマンドをクリックする。 をクリックする。

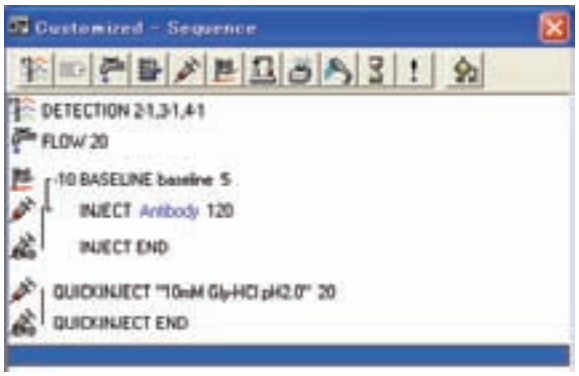


添加開始 10 秒前にベースラインを設定する。

Before にチェックを入れ、時間と Id を入力する。**Baseline** にチェックを入れる。

OK をクリックする。

↓



↓

アナライト添加終了コマンドをクリックする。

をクリックする。

添加終了 10 秒後に結合レスポンス確認のためのレポートポイントを設定する。
After にチェックを入れ、時間と Id を入力する。**OK** をクリックする。

↓

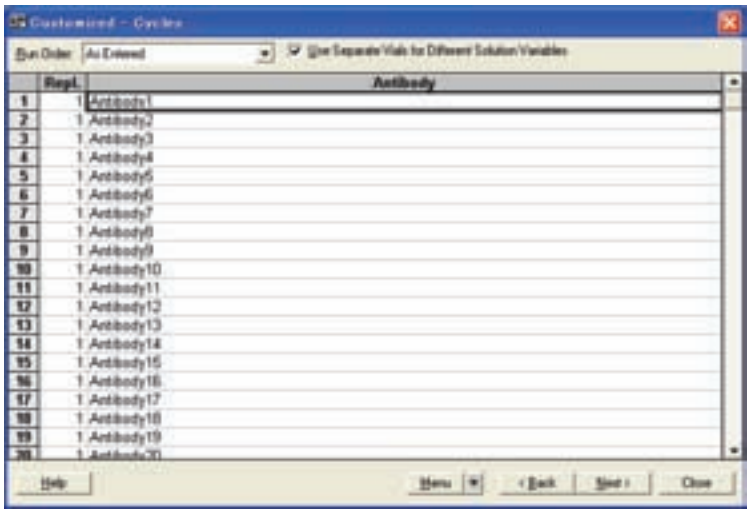
同様に、再生確認のためのレポートポイントを設定する。

↓

↓

Next >をクリックする。

↓



Repl. 同一サンプルの繰り返し測定回数を入力する。

Antibody アナライト名（同一サンプル名を複数入力すると、同一バイアルに設定される。別々のバイアルに設定したい場合に

は、サンプル名を変える。Antibody1-1、Antibody1-2 など。）

Run Order:　測定順序を選択する。

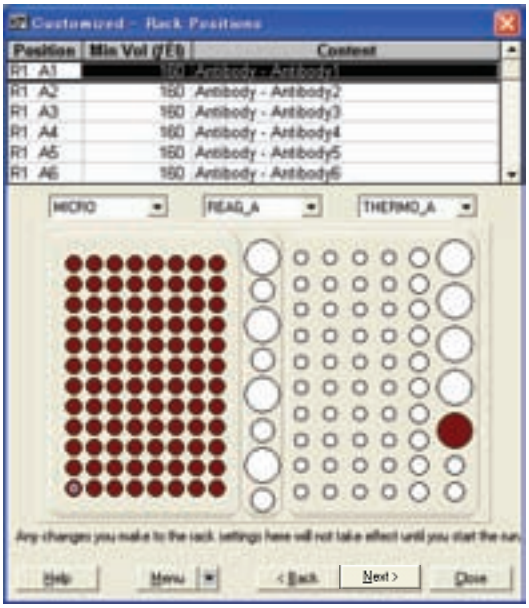
Random　入力したサンプルをランダムに測定。

As Entered　入力した順番で測定。複数の繰り返し測定を指定している場合、同じサンプルについては連続して測定する。

Step　複数の繰り返し測定を指定している場合、全ファイルにおいて一連の測定終了後、二連目を測定。

Next >をクリックする。

↓

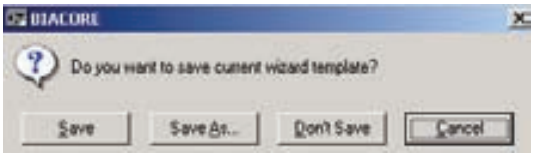


必要に応じ、アナライトと再生溶液のバイアル位置を移動する。**Next >**をクリックする。

↓

サンプルの位置および容量を再確認し、**Standby Flow After Run** にチェックを入れる。必要があれば **Prime Before Run** にチェックを入れる。**Start** をクリックする。

↓



作成したウィザードプログラムをテンプレートとして保存するかどうか、メッセージが表示される。通常は、**Don't Save** をクリックする。（結果ファイルに保存される。補足 11 参照。）

↓

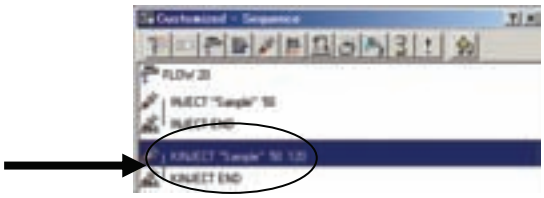
ファイルの保存先を指定し、ファイル名を入力する。
Save をクリックする。

↓

測定が開始する。
緊急停止したい場合は、キーボードの **Ctrl（左下）＋ Break（右上）**を同時に押す。

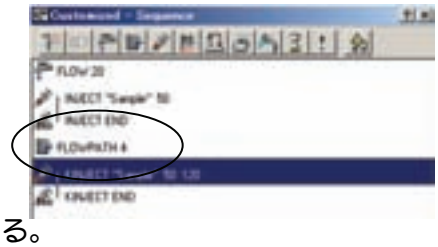
補足 31. コマンドの追加方法

設定済みのコマンドの間に新規にコマンドを追加する場合、2 つ目のコマンドをクリックし、ハイライトにする。



↓

目的のアイコンをクリックし、条件設定をおこなう。OK をクリックする。



新規にコマンドが追加される。

補足 32. コマンドの変更および削除方法

コマンドの変更

設定済みのコマンド内容を変更する場合には、該当のコマンドをダブルクリックする。

↓

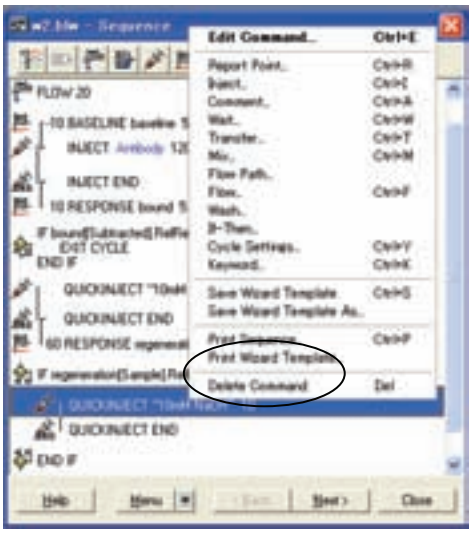
詳細設定ウインドウが開く。変更後、OK をクリックする。

コマンドの削除

削除したいコマンドをクリックし、ハイライトにする。

↓

マウスを右クリックする。Delete Command をクリックする。



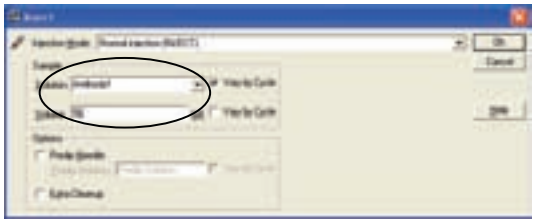
選択したコマンドが削除される。

補足 33. 多サンプル添加のプログラム作成方法

1 つのリガンドに対して、多数のアナライトを順次添加する場合には、サンプルインジェクションの設定ウインドウで、**Solution** に異なるサンプル名を入力する。
ここでは、キャプチャー法を利用した、抗体のエピトープマッピングを例に多サンプル添加のプログラムを作成する。

添加 1	抗体 1	(リガンド：Protein A にキャプチャー)
添加 2	抗原	
添加 3	抗体 2	

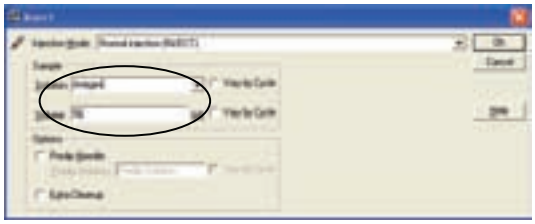
をクリックする。



Solution　　**Vary by Cycle** にチェックを入れ、Antibody1 と入力。
添加容量を入力し、**OK** をクリックする。

↓

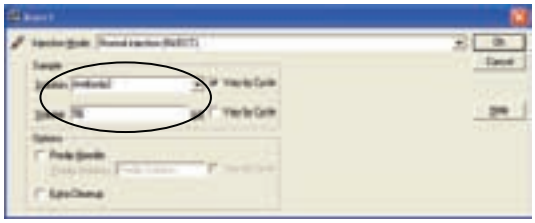
をクリックする。



Solution　　Antigen と入力。(サイクルごとに異なるバイアルから添加をおこないたい場合には、**Vary by Cycle** にチェックを入れる。)
添加容量を入力し、**OK** をクリックする。

↓

をクリックする。



Solution　　**Vary by Cycle** にチェックを入れ、Antibody2 と入力。
添加容量を入力し、**OK** をクリックする。

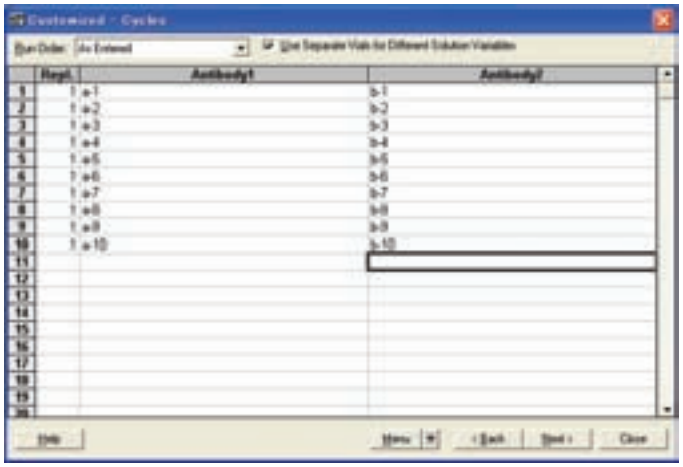
↓

引き続き、再生溶液の添加を指定する。

↓

Next >をクリックする。

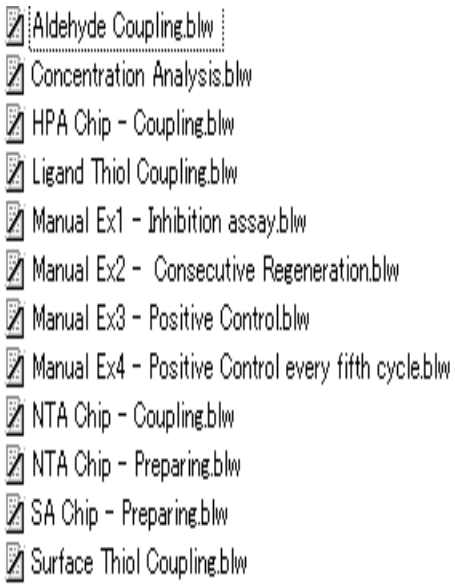
↓



Antibody1 および Antibody2 のカラムに、サンプル名を入力する。

補足 34. Customized Application ウィザードの既存テンプレート

C:/Program Files/BIACORE3000/Guide/Methods/Wizard Templates フォルダ内に、既存テンプレートが保存されている。


Aldehyde Coupling.blw
Concentration Analysis.blw
HPA Chip - Coupling.blw
Ligand Thiol Coupling.blw
Manual Ex1 - Inhibition assay.blw
Manual Ex2 - Consecutive Regeneration.blw
Manual Ex3 - Positive Control.blw
Manual Ex4 - Positive Control every fifth cycle.blw
NTA Chip - Coupling.blw
NTA Chip - Preparing.blw
SA Chip - Preparing.blw
Surface Thiol Coupling.blw

① アルデヒドカップリング
② 濃度測定
③ センサーチップ HPA への固定化
④ チオールカップリング
⑤ 阻害実験
⑥ スクリーニング
⑦ リガンド活性チェックを含むスクリーニング
⑧ 5 サンプルごとにリガンドの活性チェックを組み込んだスクリーニング
⑨ センサーチップ NTA への固定化
⑩ センサーチップ NTA 前処理
⑪ センサーチップ SA 前処理
⑫ 表面チオールカップリング

テンプレートの利用方法

Run → Run Application Wizard...をクリックする。
Customized Application を指定し、**Open template...**をクリックする。

↓

目的のウィザードテンプレートを選択し、**Open** をクリックする。

↓

Aldehyde Coupling - Wizard Template
Wizard Type: Customized Application
Notebook:
Aldehyde Coupling
A method for immobilization of ligands containing aldehyde groups to hydrazide modified supports. The method can be used for e.g. proteins with carbohydrates, where aldehydes are formed by oxidation before coupling.
(See BIAapplications Handbook for more information)
Edit...
Run
Save
Save As...
Print...
Help
Close

テンプレートについての注意書きが表示される。
内容を確認し、**Edit...**をクリックすると、Customized Application ウィザードと同様のプログラムが表示される。測定プログラムの見方および変更方法は、5-3 章参照。

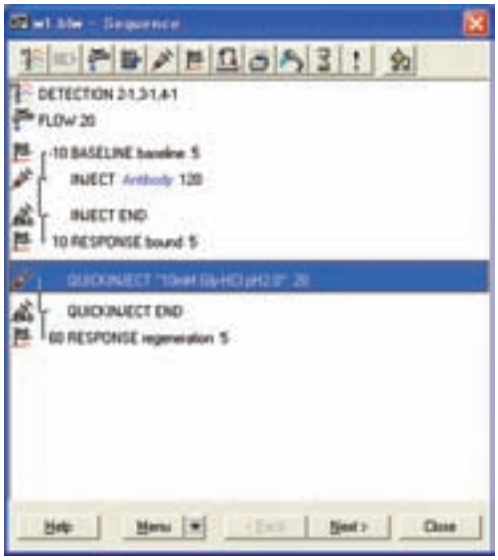
5-3-2. 再生の自動判断機能を利用したプログラム

5-3-1 では、サイクルごとに同一条件で再生を実施した。実際のスクリーニングでは、結合しないサンプルもある。リガンドの活性保持や時間短縮のため、必要に応じて再生を実施するプログラムは有効である。自動判断機能の **If / Then** コマンドを利用すると、レポートポイントのレスポンスを基準として、再生操作の省略を指定することが可能となる。また、再生が不十分な場合には、再生後のベースラインのレスポンスを基準として、再生の追加を指定することもできる。

ここでは、5-3-1 章で設定したプログラムを利用して、結合レスポンスが基準値に達しない場合の再生操作の省略と、再生が不十分な場合に再生操作を追加するための、If / Then コマンドの設定について記載する。

再生操作の省略

結合レスポンス（レポートポイント名：bound の値）が 20RU 以下の場合に、そのサイクルの再生操作を省略するプログラムを作成する。



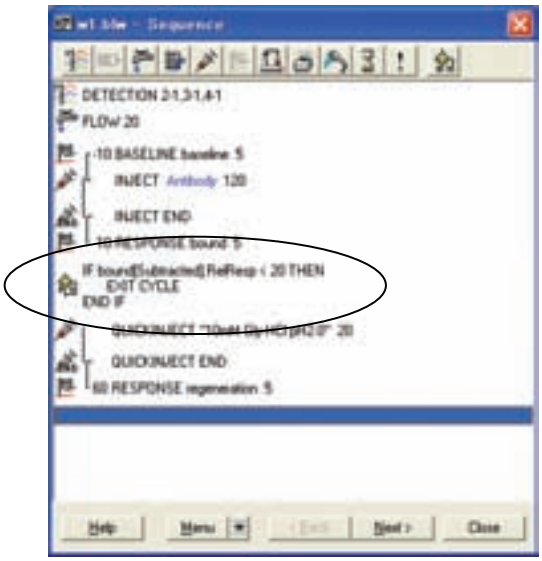
再生溶液添加コマンドをクリックし、ハイライトにする。 をクリックする。

↓

IF	RelResp	**For Report Point**	bound
In Flow Cell	Subtracted	**Comparison**	Is less Than
Value	Constant を選択し、20 と入力。		
THEN	Exit Cycle		

OK をクリックする。

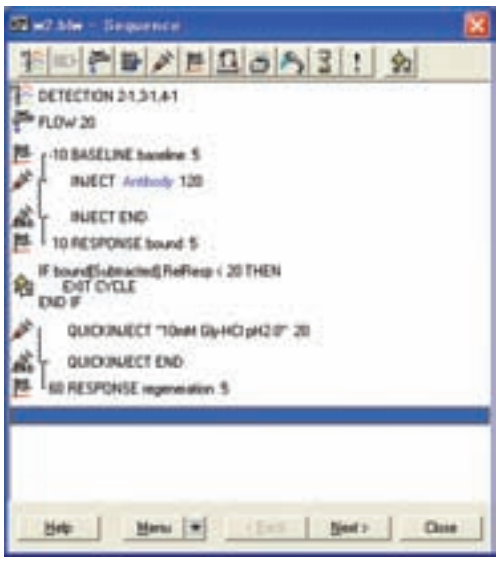
↓



コマンドが追加される。

再生操作の追加

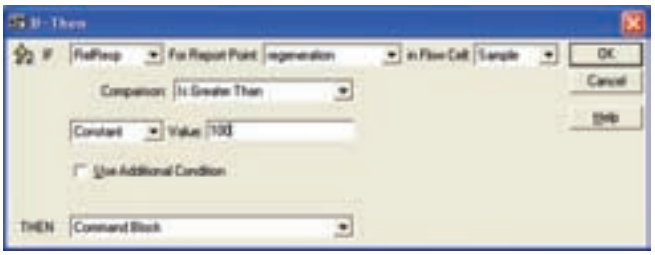
上記プログラムに、再生操作を追加する **If / Then** コマンドを設定する。ここでは、リガンド固定化セルの再生後のレスポンス（レポートポイント名：regeneration の値）が 100RU 以上の場合に、再生操作を追加する。



再生確認のレポートポイント設定コマンドの下段をクリックし、ハイライトにする。

をクリックする。

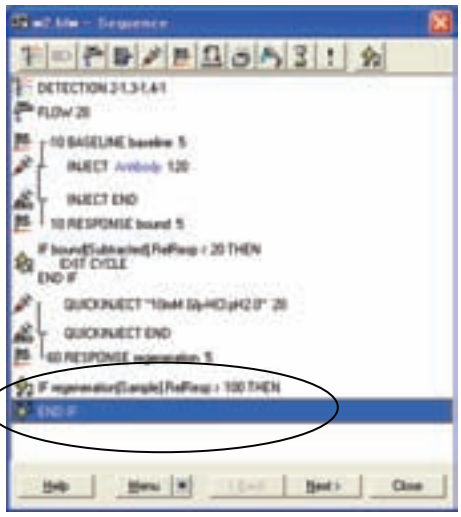
↓



IF	RelResp	**For Report Point**	regeneration
In Flow Cell	Sample	**Comparison**	Is Greater Than
Value	Constant を選択し、100 と入力。		
THEN	Command Block		

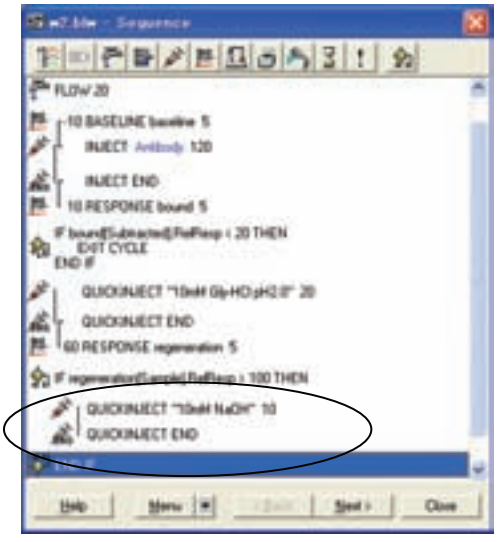
OK をクリックする。

↓



引き続き、追加の再生コマンドを設定する。**END IF** をクリックして、ハイライトにする。

をクリックし、再生条件を入力して、**OK** をクリックする。



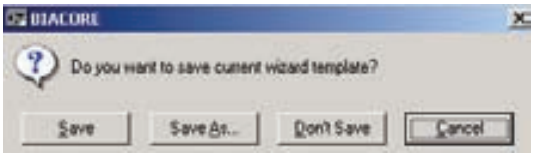
↓

必要に応じ、アナライトと再生溶液のバイアル位置を移動する。**Next >**をクリックする。

↓

サンプルの位置および容量を再確認し、**Standby Flow After Run** にチェックを入れる。必要があれば **Prime Before Run** にチェックを入れる。**Start** をクリックする。

↓



作成したウィザードプログラムをテンプレートとして保存するかどうか、メッセージが表示される。通常は、**Don't Save** をクリックする。（結果ファイルに保存される。補足 11 参照。）

↓

ファイルの保存先を指定し、ファイル名を入力する。
Save をクリックする。

↓

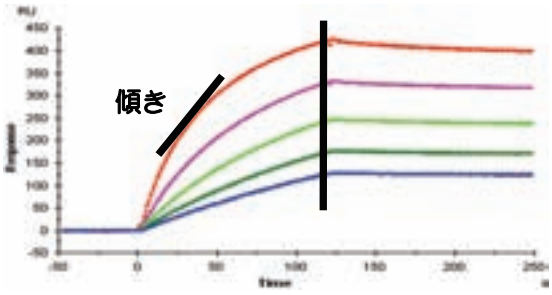
測定が開始する。
緊急停止したい場合は、キーボードの **Ctrl（左下）＋ Break（右上）**を同時に押す。

補足 35. If / Then コマンドの各種設定項目

For Report Point	評価するレポートポイント名を選択する。 プルダウンメニューに、プログラムで設定したレポートポイント名が表示される。
IF	評価するレポートポイント値の選択をおこなう。下記から選択する。 RelResp　相対量（RU）＝結合量 AbsResp　絶対量（RU） Slope　傾き（RU/s）
In Flow cell	評価するセンサーグラムを選択する。 プルダウンメニューに、取得した全センターグラムが表示される。
Value	基準となる数値（RU）を入力する。
Comparison	基準値に対する評価対象範囲の数値を下記から選択する。 Is Greater Than Is Greater Than or Equals Is Less Than Is Less Than or Equals Equals
THEN	対応項目を下記から選択する。 Exit Cycle　そのサイクルを終了し、次サイクルへ進む。 Exit Method　その時点でメソッドを終了する。 Command Block　If / Then 内に支持する操作を実行する。（対応する操作コマンドの入力が必要）

5-4. 濃度測定

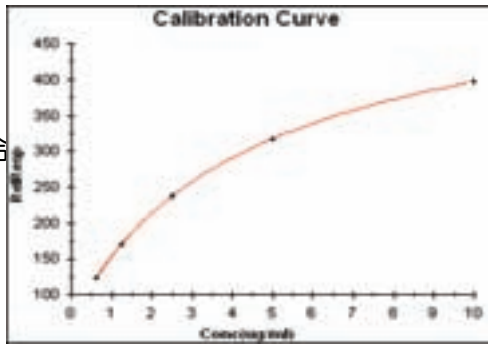
結合レスポンス



Biacore による濃度測定では、定量したい分子（A）に対して親和性を持つ分子（B）が必要となる。B を固定化したセンサーチップ表面に A を添加すると、添加した濃度に依存した結合レスポンス（RU）が得られる。数段階の濃度既知の A を添加し、その結合レスポンスを得て、検量線（RU vs C）を作成する。濃度未知の A に対しても同様に添加し、その結合レスポンスを検量線にフィッティングすることにより、濃度を算出する。
また、A 添加直後のセンサーグラムの傾き（Slop）も結合レスポンス同様に、添加している A の濃度を反映した値となるため、Slop vs C の検量線からでも定量をすることができる。

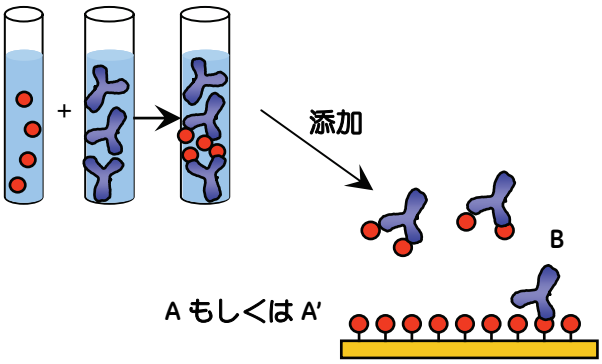
直接法と阻害法

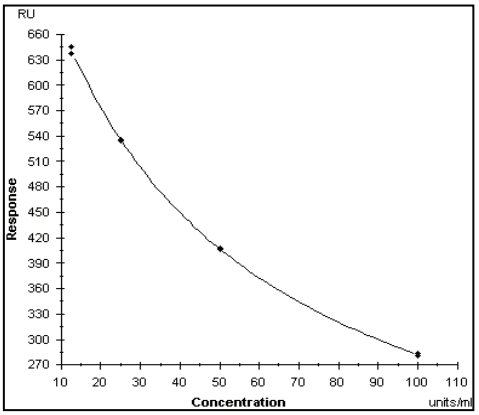
親和性を持つ分子（B）をセンサーチップ表面に固定化し、定量分子 A を添加して得られる結合レスポンスから直接 A の濃度を算出する方法を**直接法**と呼ぶ。それに対し、化合物やペプチドなど分子量が小さい分子の定量をおこなう場合 A もしくは A のアナログ（A'）をセンサーチップに固定し、定量分子 A と A に対して親和性を持つ分子 B を一定量混合した混合液を添加し、未反応の B を定量することにより、混合液中に存在する A を逆算する定量法を**阻害法**と呼ぶ。



直接法による検量線

阻害法





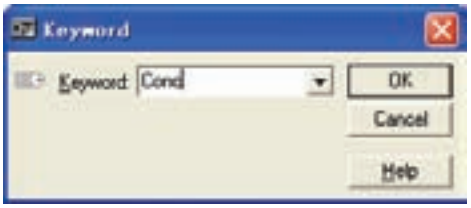
阻害法による検量線

Customized Application ウィザードで、濃度測定プログラムを作成する。基本的なプログラム作成方法は、5-3 章を参照する。

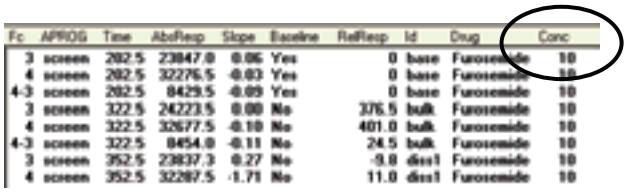
濃度測定では、結合レスポンスを利用して濃度算出をおこなう。プログラム作成時には、ベースラインと結合レスポンスのレポートポイントが必要となる。さらに、解析ソフトウェアで解析をおこなう上で、レポートポイント情報の抽出を容易にするため、サンプル名と濃度について**キーワード**の設定をおこなう。キーワード設定をおこなうと、サイクルごとに指定した任意のコメントをレポートポイントテーブルに表示できる。さらに、解析ソフトウェアで測定結果をエクセル形式で開いた際、キーワードがカラム名として表示され、指定したコメントがサイクルごとに任意のコメントが入力される。補足 36 参照。

補足 36. キーワードの設定

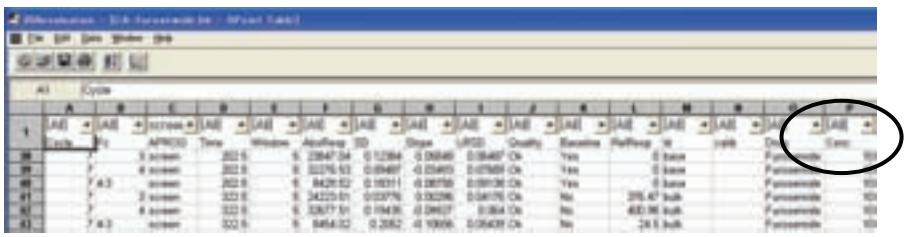
キーワードは、任意のコメントで、幾つでも設定することができる。キーワードを設定すると、各キーワードに対応するサンプル情報を、Cycles ウインドウで入力できる。キーワード情報は、サイクルごとにレポートポイントテーブルに表示され、センサーグラム上でのサンプル情報の確認が容易になる。さらに、解析ソフトウェアでレポートポイントをエクセル形式で開くと、キーワードがカラム名として表示されるので、データの抽出作業が容易におこなる（解析ソフトウェアマニュアルを参照）。
濃度測定以外にも、スクリーニングのコントロールデータの抽出などに利用できる。



レポートポイントテーブル

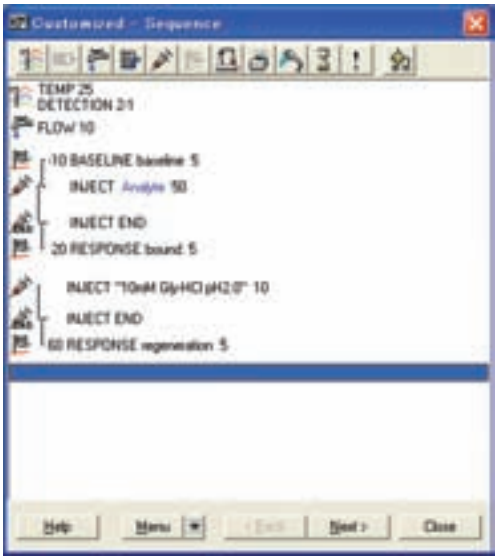


レポートポイントのエクセル形式での表示（解析ソフトウェア）



5-3 章を参照して、アナライトの添加、再生溶液添加、レポートポイントなどを設定し、測定プログラムを作成する。

↓



↓

引き続き、キーワードの設定をおこなう。

FLOW 10 をクリックし、ハイライトにする。 をクリックする。

Keyword　　Analyte（アナライトサンプル名と同一名にする）と入力。

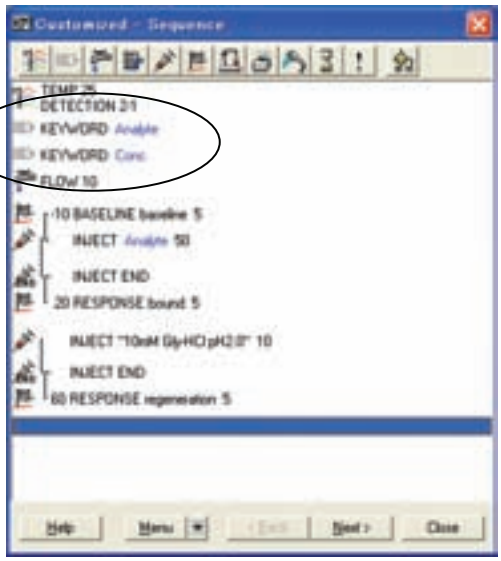
OK をクリックする。

↓

↓

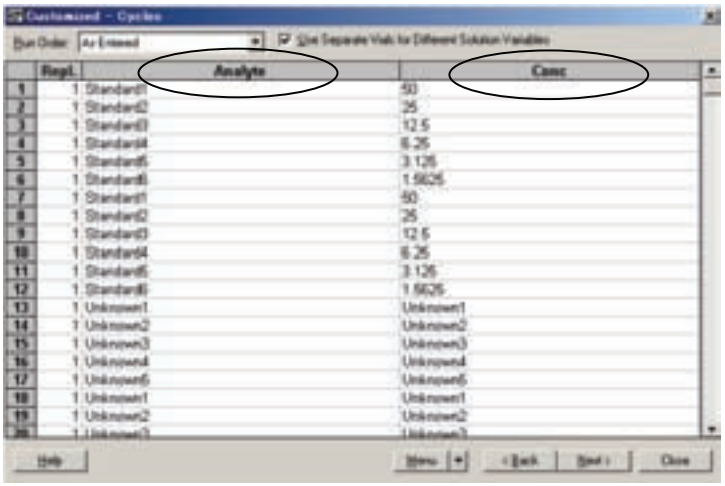
同様に、Conc（濃度）についても作成する。 をクリックする。

↓



Next >をクリックする。

↓



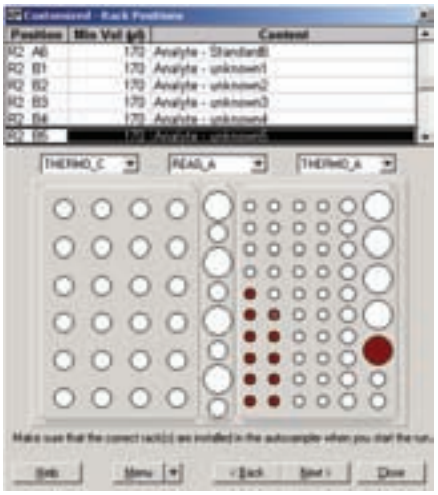
Repl.　同一サンプルの繰り返し測定回数を入力する。スタンダードサンプルおよび未知濃度サンプルは、2 回以上測定する。

Analyte　サンプル名（同一サンプル名を複数入力すると、同一バイアルに設定される。別々のバイアルに設定したい場合には、サンプル名を変える。Standard1-1、Standard1-2 など。）

Conc　濃度を入力。μg/ml などの単位は入力しない。
未知濃度サンプルは文字列を入力する。（1/100 等の希釈倍率や unknown 等を入力する。1,2 等の数値は入力しない。）

Next >をクリックする。

↓

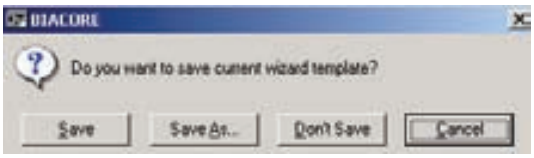


必要に応じ、アナライトと再生溶液のバイアル位置を移動する。
Next >をクリックする。

↓

サンプルの位置および容量を再確認し、**Standby Flow After Run** にチェックを入れる。必要があれば **Prime Before Run** にチェックを入れる。**Start** をクリックする。

↓



作成したウィザードプログラムをテンプレートとして保存するかどうか、メッセージが表示される。通常は、**Don't Save** をクリックする。（結果ファイルに保存される。補足 11 参照。）

↓

ファイルの保存先を指定し、ファイル名を入力する。
Save をクリックする。

↓

測定が開始する。
緊急停止したい場合は、キーボードの **Ctrl（左下）＋ Break（右上）**を同時に押す。

6. シャットダウン

6-1. 実験の終了

Standby 状態での放置	3 日以内に同様のセンサーチップで実験をおこなう場合
電源を落として終了	3 日以上使用しない場合

Standby 状態で放置

Tools → **Start Standby...**を実行。
5 µl/min の流速で最大 96 時間、ランニング緩衝液を送り続ける操作。96 時間の **Standby** でランニング緩衝液の消費量はおよそ 80 ml 程度である。
週末に使用しないような場合、**Standby** を実行する。

電源を落として終了

電源を落とす場合には、流路系等に塩の析出を防ぐため、システムを超純水で置換する。
洗浄には洗浄用センサーチップを使用する。
2 つのステップを実施する。

①**超純水水**で **Prime** を実行
ランニング緩衝液ボトルを超純水水ボトルに置き換える。
Tools → **Working Tools...**をクリックし、**Prime** を実行する。

②引き続き **Close** を実行
16 mm ガラスバイアルに超純水水を 3 ml 入れ、 **R2F3** におく。
Tools → **Working Tools...**をクリックし、**Close** を実行する。

6-2. センサーチップの取り出し

Command → Undock...をクリックし、**Undock** を実行する。

↓

フロントパネルの Sensorchip の緑のライトが点灯から点滅に変わったら、センサーチップを抜きとる。

↓

Biacore システム、コンピュータ、モニター、プリンターの電源を落とす。

↓

ランニング緩衝液、廃液瓶をかたづける。

6-3. センサーチップの保存

実験使用後抜き取ったセンサーチップは、以下の方法で保存することができる。

ドライ状態での保存

取り出したセンサーチップを 50 ml 容の蓋付きプラスチック管等に入れるか、もしくはパラフィルムで覆い、4 ℃で保存する。安定なタンパク質やペプチド、DNA を固定したセンサーチップの保存に用いる。

ウェット状態での保存

取り出したセンサーチップのシート部分をカバーから抜き取りシートだけを、緩衝液を入れた容器（50 ml 容の蓋付きプラスチック管等）に入れ、4 ℃で保存する。センサーチップを再利用するときには、シートについた緩衝液を拭き取ったあと、カバーに戻し使用する。リガンドを固定している側は、細くとがらせたキムワイプ等を四角の隅にあて、余分な緩衝液を吸い取る。リガンドの固定していない側は反射面となるので、キムワイプ等で全体をきれいに拭き取る。特に反射面には濁りや汚れ等がないように注意する。金膜部分以外の白い部分は、キムワイプ等でしっかり拭き取る。

サンプルの種類によっては、どちらの方法を用いても、保存中に変性する場合があるので、再 Dock 後、ポジティブコントロールサンプルで活性を確認すること。

7. メンテナンス

7-1. システムの洗浄

Tools → **Working Tools...**のコマンドを用いて実施する。

実験の前後

Prime

新しいセンサーチップを **Dock** したときやランニング緩衝液を交換するときにおこなう操作である。ポンプや IFC（マイクロ流路系）、オートサンプラー等をランニング緩衝液（実験前）または超純水（実験後）で置換洗浄する。（所要時間約 6 分 30 秒間）
大きく塩濃度が変化する緩衝液や粘性の異なる緩衝液に交換する場合には、**Prime** を 2～3 回繰り返すことをお奨めする。

実験途中のランニング緩衝液による洗浄

Flush

IFC、フローセルをランニング緩衝液で簡単に洗浄。（所要時間約 3 分間）

Rinse

IFC、フローセルをランニング緩衝液で高流速洗浄。（所要時間約 8 分間）

定期的な洗浄

Desorb　**毎週 1 回実施**

IFC やフローセル等に付着したタンパク質や脂質を洗浄。BIA maintenace kit 中の **BIAdesorb solution 1（0.5 % SDS 溶液）**および **BIAdesorb solution 2（50 mM Gly-NaOH、pH 9.5）**を使用。（所要時間約 22 分間）

ラックベース 2（右側）	Thermo_A
ランニング緩衝液	**超純水**
R2F3	BIAdesorb solution 1　3 ml
R2F4	BIAdesorb solution 2　3 ml

補足 37. Desorb の注意事項

① BIAdesorb solution 1 は 4℃で保存すると結晶が析出するので、室温におくこと。
② センサーチップに固定してあるリガンドは失活するので、必ず洗浄用のセンサーチップと入れ替えておこなう。
③ 設定温度を 20℃以下でおこなわない。
④ **Desorb** 終了後、超純水あるいはランニング緩衝液で **Prime** を 1～2 回おこなう。

Sanitize　毎月 1 回実施

IFC やフローセルを殺菌する。病原性があるサンプル等を使用したときには、適時 **Sanitize** を実行する。BIA maintenance kit 中の **BIAdisinfectant　solution（次亜塩素酸ナトリウム溶液）**と**超純水**を使用する。

ステップ 1	1.5 ml の BIAdisinfectant　solution を BIA メンテナンスキット内の専用の容器に入れ、20 ml の超純水で希釈し、ランニング緩衝液の位置におき実行する。
ステップ 2	超純水 15 ml をランニング緩衝液の位置におき実行する。

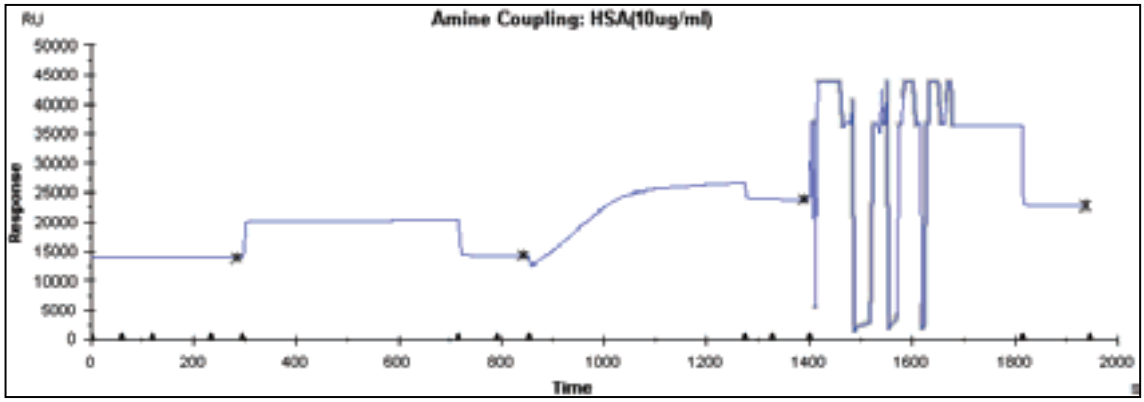
補足 38. Sanitize の注意事項

① センサーチップに固定しているリガンドは失活するので、必ず洗浄用のセンサーチップと入れ替えておこなう。

② **Sanitize** 終了後、超純水あるいはランニング緩衝液で **Prime** を 1～2 回おこなう。

7-2. エアーが混入したときの対処法

脱気していない緩衝液を使用した場合や、エアーを添加した場合に、エアーが流路系内に留まってしまうことがある。



このような場合には、以下の操作を順次おこない、エアーの除去をおこなう。

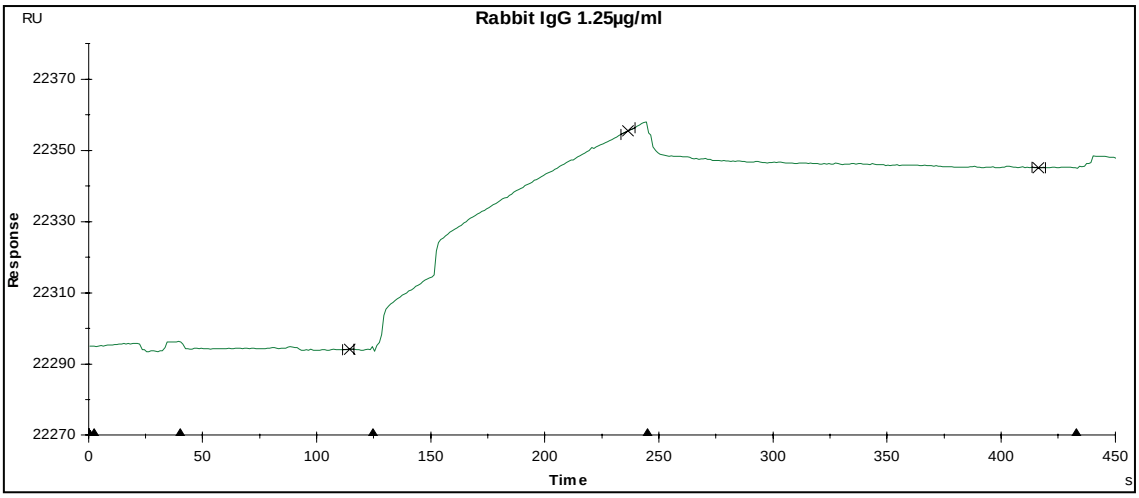
① **Tools → Working Tools... → Prime**、**Flush**、あるいは **Rinse**
組み合わせて数回実施。

② **Tools → Service Tools... → Unclogging**

乱れが解決しない場合には、IFC（マイクロ流路系）の劣化の可能性が考えられるので、システムチェック（7-4 章参照）をおこなってシステムの状態を確認する。

7-3. 流路系に詰まりがあるときの対処法

不溶性のサンプルや吸着性の高いサンプルを使用することで、流路が詰まる場合がある。このような場合、センサーグラム（特に試料添加中）に乱れが発生する。



Tools → Service Tools... → Unclogging
ランニング緩衝液を高流速で流し、詰まりを除去する。

7-4. システムチェック

ベースラインがドリフトするなどシステムの調子が思わしくない場合には、以下の方法でシステムチェックをおこなう。定期的に実施することをお奨めする。

使用するもの

① 新しいセンサーチップ CM5(すでに固定化をおこなっているチップは使用できない)
② HBS-EP 緩衝液
③ 9 mm ガラスバイアル
④ BIAtest soluton　(BIA maintenance kit)

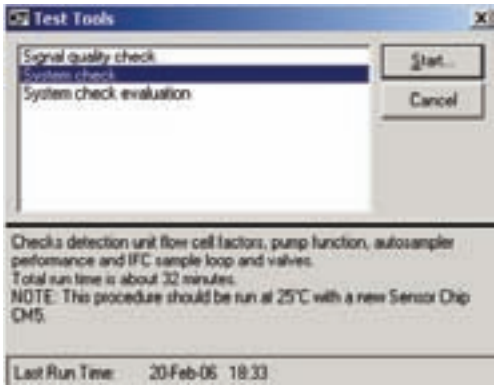
（方法）
Desorb、**Sanitize** 終了後、新しいセンサーチップを **Dock** する。
HBS-EP 緩衝液で **Prime** を実施。

↓

ラックベース 2	Thermo A
R2F1	**BIAtest solution**　1 ml（9 mm ガラスバイアル）
R2E1、E2、E3	空の 9 mm ガラスバイアル

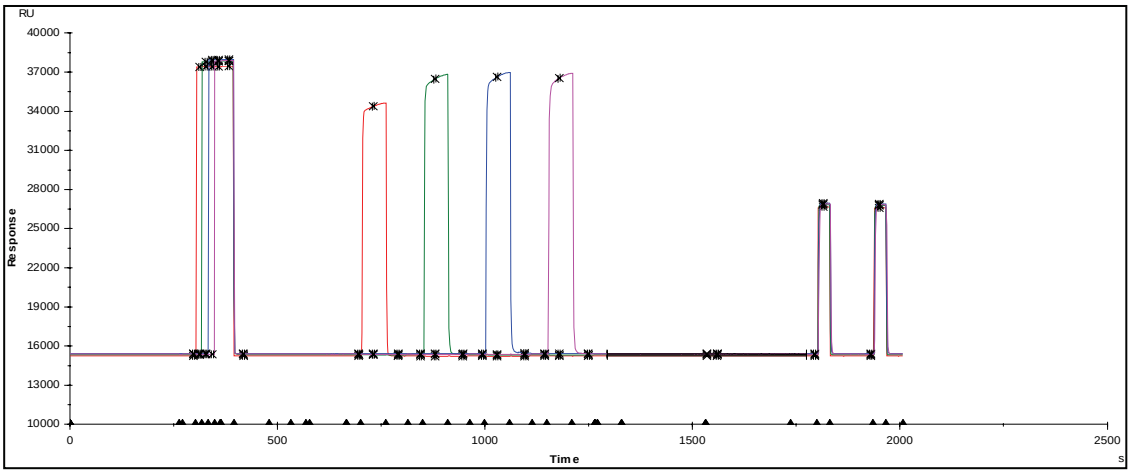
↓

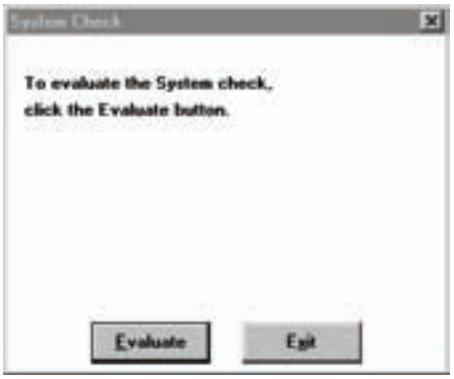
Tools → Test tools → System check をクリックする。



Start...をクリックする。（所要時間：約 40 分）

↓

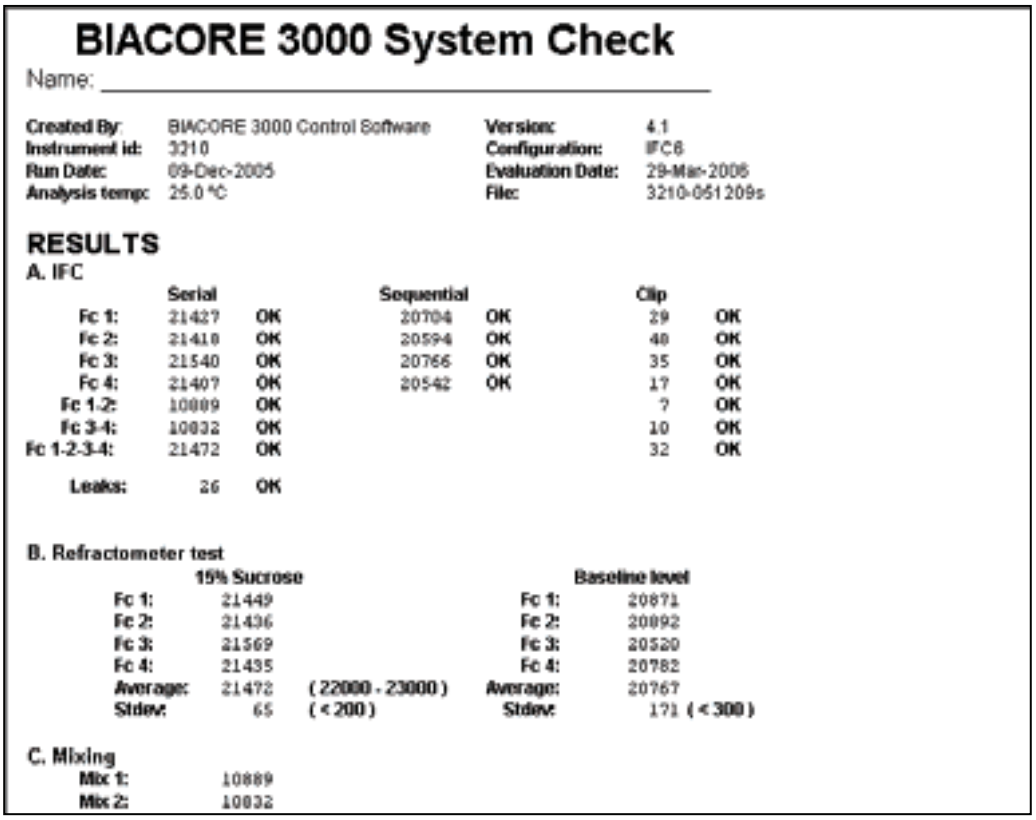




測定終了後、上記のようなボックスが表示される。

↓

Evaluate をクリックする。



BIACORE 3000 System Check

Name: _____

Created By:	BIACORE 3000 Control Software	**Version:**	4.1
Instrument id:	3210	**Configuration:**	IFC6
Run Date:	09-Dec-2005	**Evaluation Date:**	29-Mar-2006
Analysis temp:	25.0 °C	**File:**	3210-051209s

RESULTS

A. IFC

	Serial		Sequential		Clip	
Fc 1:	21427	**OK**	20704	**OK**	29	**OK**
Fc 2:	21418	**OK**	20594	**OK**	48	**OK**
Fc 3:	21540	**OK**	20766	**OK**	35	**OK**
Fc 4:	21407	**OK**	20542	**OK**	17	**OK**
Fc 1-2:	10889	**OK**			7	**OK**
Fc 3-4:	10832	**OK**			10	**OK**
Fc 1-2-3-4:	21472	**OK**			32	**OK**
Leaks:	26	**OK**				

B. Refractometer test

	15% Sucrose			Baseline level	
Fc 1:	21449		**Fc 1:**	20871	
Fc 2:	21436		**Fc 2:**	20892	
Fc 3:	21569		**Fc 3:**	20520	
Fc 4:	21435		**Fc 4:**	20782	
Average:	21472	**(22000 - 23000)**	**Average:**	20767	
Stdev:	65	**(< 200)**	**Stdev:**	171	**(< 300)**

C. Mixing

Mix 1:	10889
Mix 2:	10832

結果が表示される。

問題がある場合には **check** マークが表示され、エラーが出た場合の対処方法が後半部分に記載されている。**check** マークが表示された箇所もしくは設けられた基準値からずれている値があれば、対処方法に従って、システムをメンテナンスする。改善されない場合は、弊社技術サービス部に連絡をする。

8. データ管理

実験結果ファイルは各自のフォルダ内に保存する。各自のフォルダは以下の方法で **Bia Users** フォルダの中に作成する。

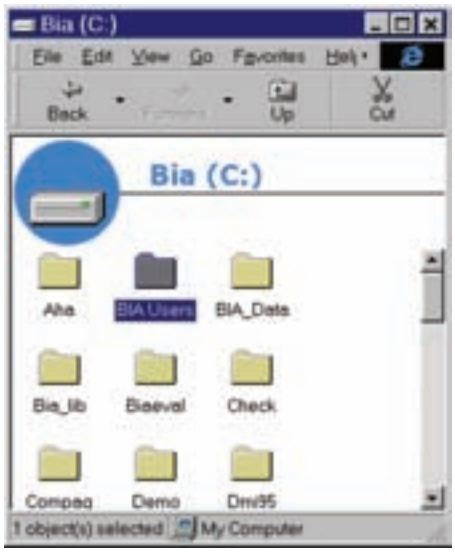
My Computer から作成する方法

Windows 初期画面の **My Computer**（

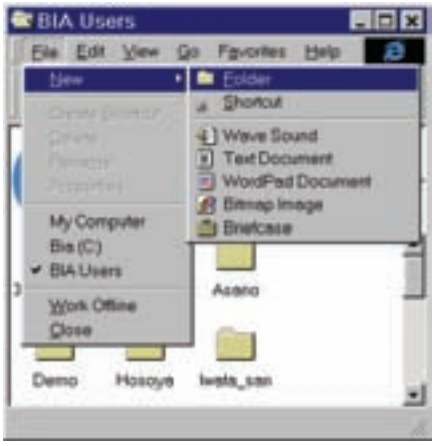
） をクリックする。

↓

Bia(C)：をクリックし、**Bia Users** のフォルダをダブルクリックして開く。



↓



File → **New** → **Folder** をクリックし、フォルダ名入力後、**Enter** をクリックする。

Explore から作成する方法

Start → **Program** → **Windows Explores** をクリックする。

↓

C:（ハードディスク）の中の **Bia Users** のフォルダをハイライトにし、**File** → **New** → **Folder** をクリックする。

↓

フォルダ名を入力し、**Enter** をクリックする。

補足 39. フォルダ作成における注意事項・解説

自分のフォルダは **Bia Users** の中に作成する。他のフォルダ内に作成すると（たとえば Biacore 等）、ソフトウェアの再インストール時に、消去されてしまう場合がある。
各自のフォルダの中に、さらに詳細なフォルダを作成することも可能である。日付あるいは実験内容別に、細かくフォルダを分類すると便利である。

補足 40. ファイルの容量について

基本的な実験での各ファイルの容量はおおよそ以下のようになる。

固定化

アミンカップリング	
1 個のフローセルを使用した場合	約 20 kb
4 個のフローセルを使用した場合	約 76 kb
チオールカップリング	
1 個のフローセルを使用した場合	約 20 kb

相互作用

1 個のフローセル使用、5 サンプルの場合	約 90 kb
5 個のフローセル使用、5 サンプルの場合	約 150 kb

9. Surface Prep ユニット

9-1. Surface Prep ユニットの特性

Surface Prep ユニットは Biacore 3000 に装着して使用する外付けユニットであり、センサーチップを装着することでフローセルを形成し、マイクロ流路系（IFC）を介さずに固定化や回収操作をおこなうことができる。マイクロ流路系にはない化学耐性を持ち、パーツの交換によりマイクロ流路系よりも面積の大きなフローセルを形成することができる。これらの特性を利用して、Surface Prep ユニットは下記の目的に有利である。

- 水に難溶性の物質の固定化
- 結合分子の回収

ただし、Surface Prep ユニットを用いる固定化や回収の実験では、その様子をセンサーグラムとしてモニターすることができない。

補足 41. サーフェスプレップユニットの化学耐性

溶液	濃度	耐性
Acetonitrile	100%	使用可
Dimethylformamide(DMF)	80%	30 min
Dimethylsulphoxide(DMSO)	100%	30 min
Dioxane	50%	30 min
Ethylenediamine	1M（水溶液）	30 min
Ethanol	100%	30 min
Methanol	100%	30 min
3-Methylaminopropylamine	1M（水溶液）	30 min
Tetrahydrofuran(THF)	100%	不適*

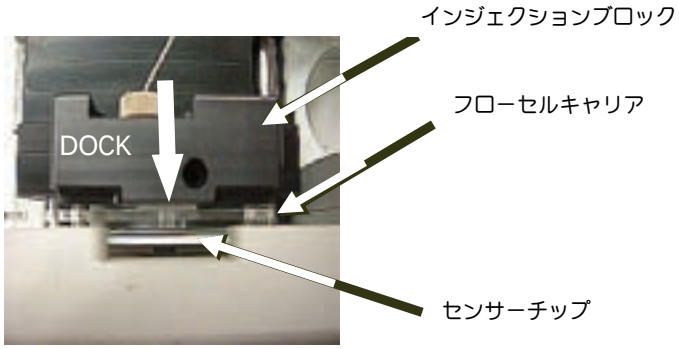
9-2. Surface Prep ユニットの概要

Surface Prep ユニットは、Surface Prep 本体、インジェクションブロック、フローセルキャリア（FCC）から成る。

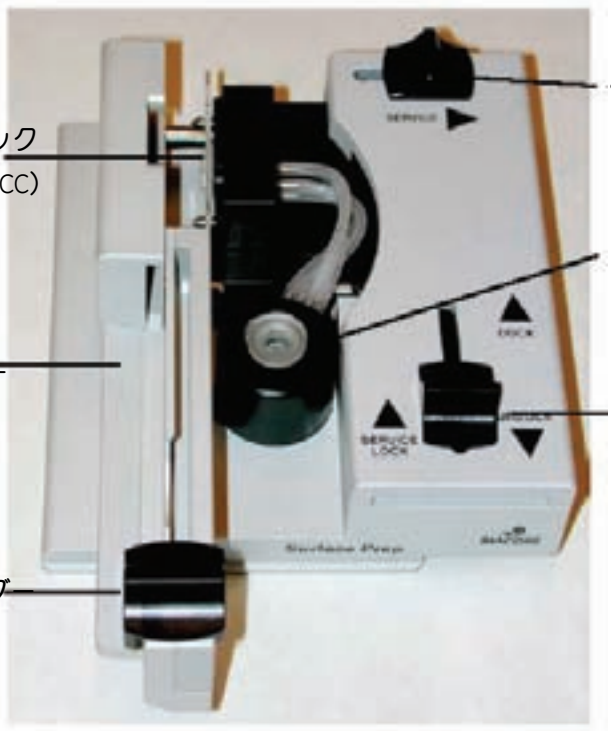
インジェクションブロック

フローセルキャリア

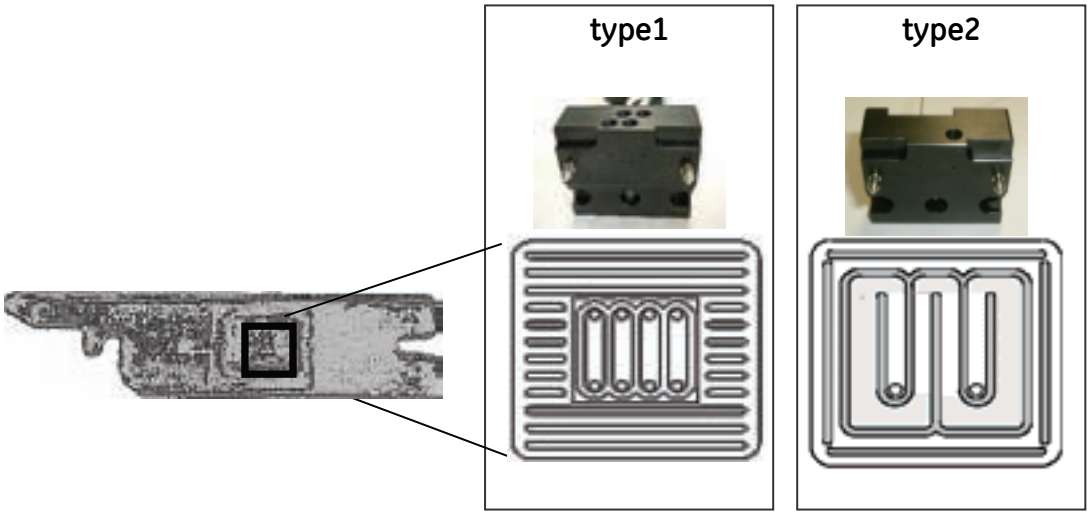
インジェクションブロックは、ニードルからの溶液の添加を受け、フローセルキャリアへの送液をサポートする部品である。フローセルキャリアは、Biacore 3000 でのマイクロ流路系に相当するものである。センサーチップとフローセルキャリアを組み合わせることで、フローセルが形成される。



補足 42. 各部の名称



インジェクションブロックとフローセルキャリアにはタイプ 1 , タイプ 2 の二種類がある。目的に応じて使い分ける。



水に難解性の物質の固定化をおこなう場合には、タイプ 1 を使用する。タイプ 1 はマイクロ流路系を用いる場合と同様な 4 つのフローセルを形成する。ただし各フローセルは完全に独立しており、複数のフローセルへ同時に流すことはできない。
結合分子の回収をおこなう場合には、タイプ 2 を使用する。タイプ 2 は大きなフローセル（16 mm^2）を一つ形成する。これはマイクロ流路系やタイプ 1 のフローセル一つ分に対して、約 13 倍の面積を持つ。マイクロ流路系と比較し、流路を短くすることで、流路への吸着による結合分子回収量のロスを抑えている。

補足 43. インジェクションブロック タイプ 2 の廃液チューブ

弊社では廃液チューブ単品の販売はしていない。
インジェクションブロックタイプ 2 廃液チューブの交換には、下記の製品を使用する。
メーカー UPCHURCH SCIENTIFIC

MICRO FINGER TIGHT PEEK,(10PK)	F-125X
MICRO SLEEVE (SLV),(10PK)	F-187X
PEEK TUBING (Natural). 010x.020x5' (10 cm にカットして使用)	1542
Polymer Capillary Tubing Cutter (チュービングカッター)	A-350

9-3. セットアップ

9-3-1. システム本体の準備

Biacore 3000 本体と付属のコンピュータなど周辺機器の電源を立ち上げる。

↓

Biacore 3000 Control Software を立ち上げる。

↓

Sensor Chip Maintenance あるいは不要なセンサーチップを本体に挿入し **Dock** をおこなう。

↓

ランニング緩衝液を用いて本体の **Prime** をおこなう。

Command → Rack Base...で、ラックベース 2 に Surface Prep を設定する。

9-3-2. Surface Prep ユニットの準備

インジェクションブロックとフローセルキャリアの装着

サービススライダーを右に引きながら、**ドッキングスライダー**を **SERVICE LOCK** の位置に移動する。

↓

インジェクションブロックの 2 つのネジ穴にネジを差し込んだ状態で、Surface Prep ユニットの装着位置にセットする。上図の矢印で示すセンサーチップホルダーの穴から、2.5 mm アレンキーを使って 2 つのネジをしっかり締める。

↓

フローセルキャリアを装着する。

↓

（タイプ 1）蓋をはずした廃液入れをセットする。インジェクションブロックにつながっている廃液カバーをかぶせる。
（タイプ 2）蓋をした廃液入れに、インジェクションブロックに付属の O-リングをはめた状態でセットする。インジェクションブロックから出ている廃液チューブを廃液入れの蓋のホールへ差し込む。

補足 44. 廃液入れについて

O-リング

廃液入れ

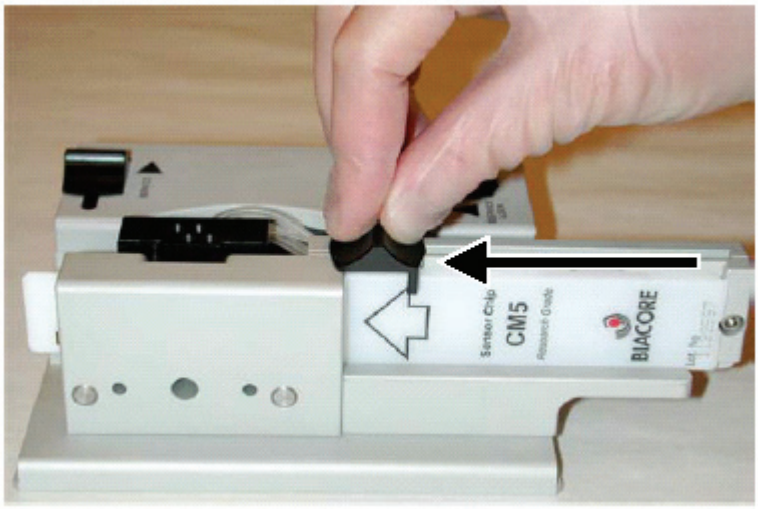
Surface Prep ユニットには専用の廃液入れがある。
Surface Prep タイプ 1 使用時は、蓋をはずした状態で使用する。
Surface Prep タイプ 2 使用時は、蓋をした状態で、O-リングをはめて使用する。

9-3-3. Surface Prep ユニットへのセンサーチップのドッキング

ドッキングスライダーが **SURVICE LOCK** の位置にあることを確認し、**センサーチップスライダー**を手前まで引く。

↓

センサーチップホルダーにセンサーチップをセットする。ホルダーに軽く押しつけた状態で**センサーチップスライダー**を奥まで押しこみ、センサーチップ内のシートをスライドさせる。



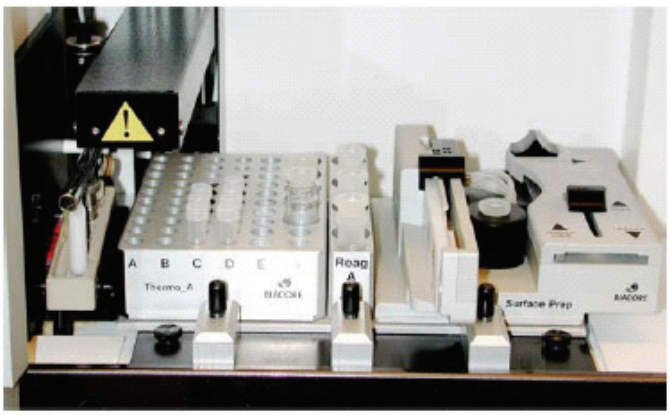
サービススライダーに手を添えながら**ドッキングスライダー**を一度手前（UNDOCK 側）に戻し、**SURVICE LOCK** をはずす。

↓

ドッキングスライダーを **DOCK** まで押しこむ。

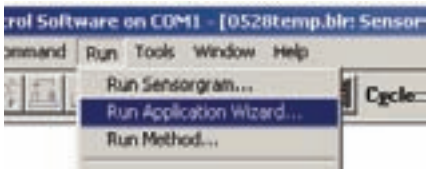
9-3-4. Surface Prep ユニットのシステムへの装着

``**BIACORE**"と``**Surface Prep**"の表示のある面を手前にして、Surface Prep ユニットをラックベースに装着する。

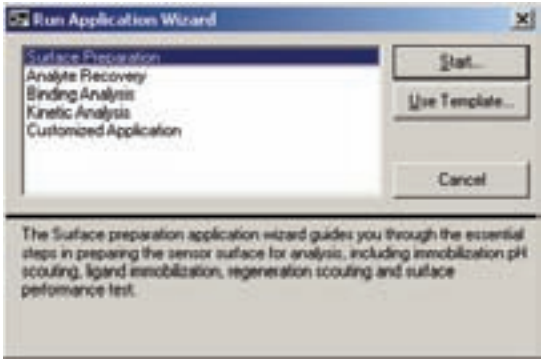


9-4. リガンドの固定化

Run → Run Application Wizard...をクリックする。

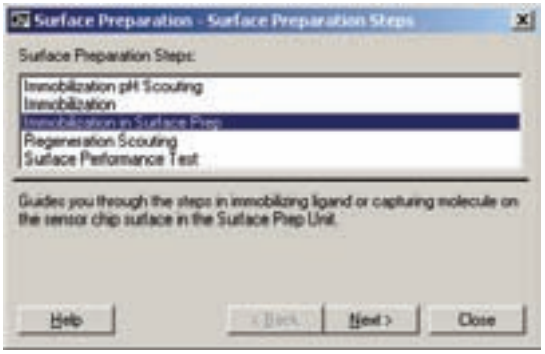


↓


Run Application Wizard
Surface Preparation
Analyte Recovery
Binding Analysis
Kinetic Analysis
Customized Application
Start...
Use Template...
Cancel
The Surface preparation application wizard guides you through the essential steps in preparing the sensor surface for analysis, including immobilization pH scouting, ligand immobilization, regeneration scouting and surface performance test.

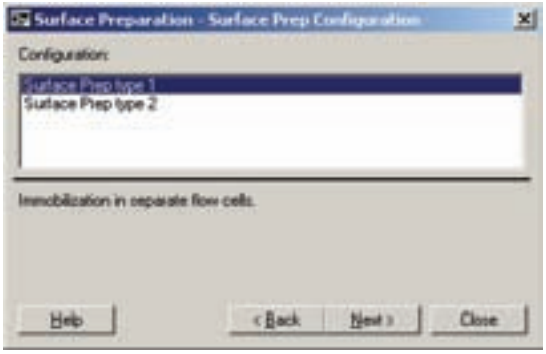
Surface Preparation を選択し、**Start...**をクリックする。

↓


Surface Preparation - Surface Preparation Steps
Surface Preparation Steps:
Immobilization pH Scouting
Immobilization
Immobilization in Surface Prep
Regeneration Scouting
Surface Performance Test
Guides you through the steps in immobilizing ligand or capturing molecule on the sensor chip surface in the Surface Prep Unit.
Help
< Back
Next >
Close

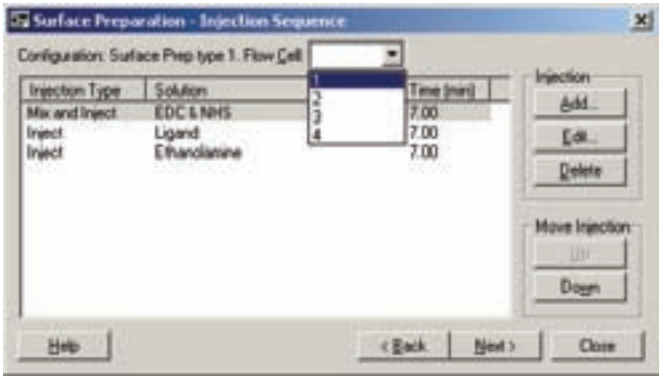
Immobilization in Surface Prep を選択し、**Next >**をクリックする。

↓



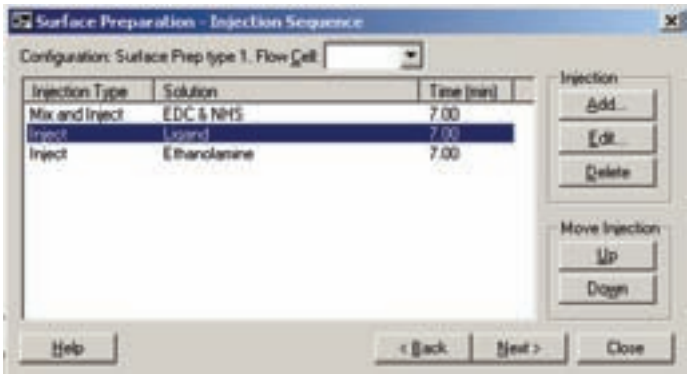
Surface Prep type 1 もしくは **Surface Prep type 2** を選択、**Next >**をクリックする。

↓



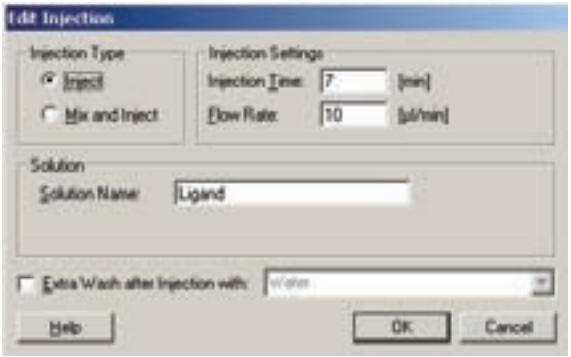
アミンカップリング法の標準プロトコールが表示される。
タイプ 1 の場合、固定化するフローセルを選択し、固定化条件を確認後、**Next >**をクリックする。

補足 45. 添加条件の内容確認と変更



Injection Sequence ボックス中の各添加コマンドの詳細条件は、そのコマンドを選択後、**Edit...**をクリックすると確認できる。

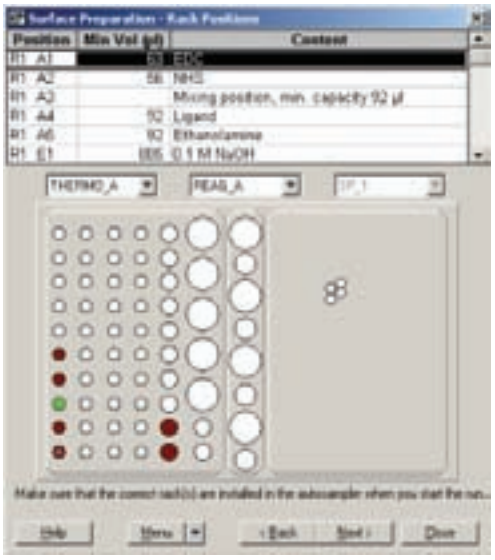
↓



添加条件を変更する場合も、同様に条件を変更し、**OK** をクリックして確定する。添加可能な量は 5～300 µl で、添加時間の最小値と最大値は、流速によって決定される。流速は 1～100 µl/min の間で変更可能。

添加コマンドの追加	追加したい順番の行を選択後、**Add...**をクリックする。
添加コマンドの削除	そのコマンドを選択後、**Delete...**をクリックする。
添加コマンドの移動	そのコマンドを選択後、**Up** あるいは **Down** をクリックする。

↓

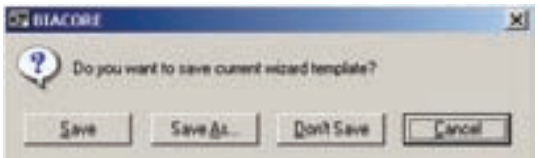


必要な溶液と容量、セットするバイアル位置が表示される。
各溶液を必要量セット後、**Next >**をクリックする。

↓

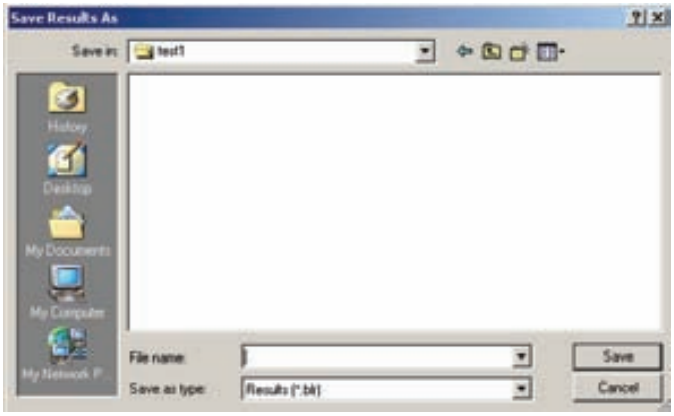
バイアル位置の再確認をおこなう。**Standby Flow After Run** にチェックを入れる。また、固定化の前に Biacore 3000 本体の Prime を再度実行する場合には **Prime Before Run** のチェックボックスにチェックを入れる。
Start をクリックする。

↓



作成したウィザードプログラムをテンプレートとして保存するかどうか、メッセージが表示される。通常 **Don't Save** をクリックする。(測定結果に保存される。補足 11 参照)

↓

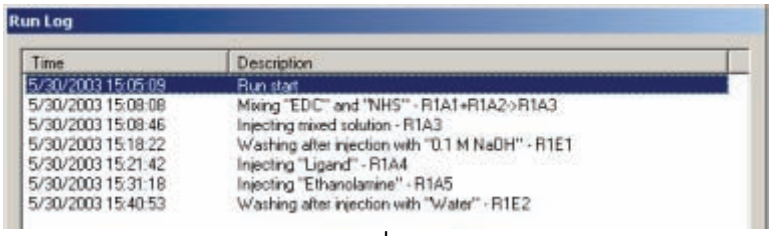


保存先のフォルダを選択し、ファイル名を入力する。
Save をクリックすると固定化が開始する。

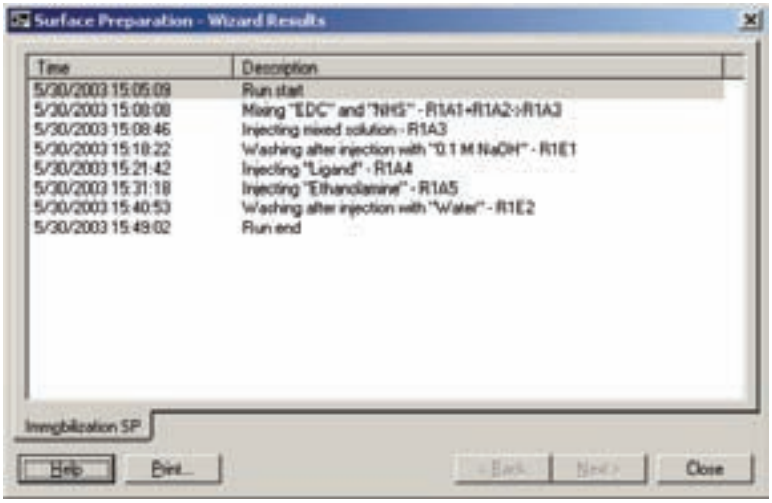
緊急停止したい場合は、キーボードの **Ctrl（左下）＋ Break（右上）**を同時に押す。

↓

ウィザード実行中はランログ画面が表示される。（センサーグラムは表示されない）



↓



固定化が完了すると結果画面が表示される。**Close** をクリックしてウィザードを終了する。

↓

システム本体は **Standby** 状態である。**Tools → Stop Standby** で終了する。

↓

実験終了後、速やかに Surface Prep ユニットのメンテナンスを実行する。

9-5. 結合アナライトの回収

マイクロ流路系および Surface Prep ユニットの使い分け

結合分子の回収は、本体のマイクロ流路系を介しても、Surface Prep ユニットを介しても可能である。

マイクロ流路系

フローセル面積が小さく、回収流路が長いため、流路系への吸着による回収サンプルのロスが大きい。しかし、回収の過程をセンサーグラムとしてモニターすることができる。

Surface Prep タイプ 2

フローセルの面積が大きく、流路が短いため、マイクロ流路系に比べて 1 回の回収量が多い。しかし、Surface Prep ユニットを使用する場合は、センサーグラムを得ることができないので、回収過程をモニターできない。

従って、回収条件の確認や微調整は、過程をモニターできるマイクロ流路系を使用し、その後、Surface Prep ユニットで回収作業をおこなうのが理想的である。

アナライト濃度および調製

結合反応は平衡反応であるため、できるだけ高濃度のアナライトを用いるほうが、1 度の添加でより効率よく結合分子を得ることができる。特に低親和性の結合では結合分子の回収率に大きく影響する。

また、血清等のアナライトの添加は、センサーチップ表面へ非特異的結合を生じやすい。

どの程度のアナライト濃度を用いて添加すれば、純度の高い結合分子を効率よく回収することができるのか、また何回程度繰り返し結合回収作業をおこなえば、必要量を回収することができるのか等を判断するために、アナライトの添加条件をモニターしながら検討することは重要である。

補足 46. 回収サンプルを質量分析計へ持ち込む場合の注意事項

MS（質量分析）適合緩衝液の検討

相互作用測定時の緩衝液には、質量分析を阻害する成分（例、NaCl、Surfactant P20、DMSO、リン酸緩衝液など）が多く含まれている。回収サンプル溶液中への、これらの成分の混入を抑えるために、アナライト添加後、回収操作前に、センサー表面や流路を洗う操作がおこなわれる。その洗浄溶液として、炭酸水素アンモニウムなどの揮発性の緩衝液が用いられるが、Tris や HEPES などの通常の緩衝液も低濃度で使用することができる（MALDI では 20 mM 未満、ESI では 1 mM 未満）。

回収溶液の検討

回収サンプル溶液を直接質量分析に持ち込むためには通常サンプルを酸性化することが必要である。低濃度の酸は結合したアナライトを再生するのに適している場合が多く、回収溶液に0.5 % TFA（MALDI）や0.1 %酢酸(ESI)を利用すれば、回収サンプル溶液を直接質量分析で解析することができる。質量分析の前にZipTip™（Millipore）などのマイクロ逆相カラムで精製をおこなう場合には、回収溶液として、アルカリ溶液（e.g. 50 mM NaOH）なども使用できる。

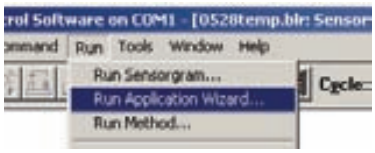
補足 47. 回収時のニードルの洗浄について

回収操作をおこなう際には、あらかじめニードルを洗浄し、汚れを落としておくことが非常に重要である。回収量は 2 µl という少量の溶液を取扱うため、ニードルの先端が汚れていると、溶液をチューブ等に集めることができない場合がある。回収操作の前には、十分ニードルの洗浄をおこなうか、新しいニードルに交換し、予備実験をおこなって、 2 µl 程度の溶液が回収できることをあらかじめ確認することが望ましい。

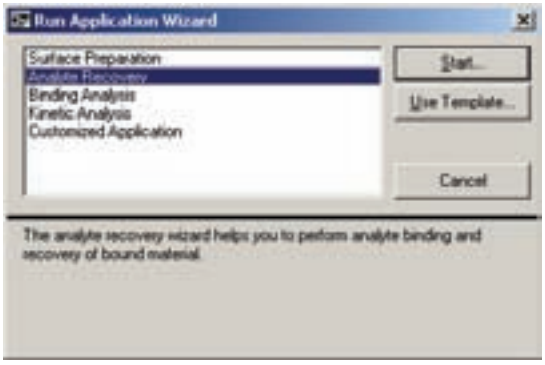
9-5-1. マイクロ流路系を用いた回収条件の確認

あらかじめマニュアル測定により、アナライトの添加条件や再生条件を決めておく。その条件を回収プログラムに導入し、微調整をおこなう。

Run□**Run Application Wizard...**をクリックする。

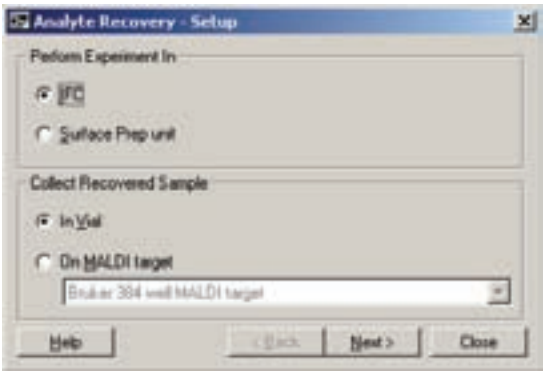


↓



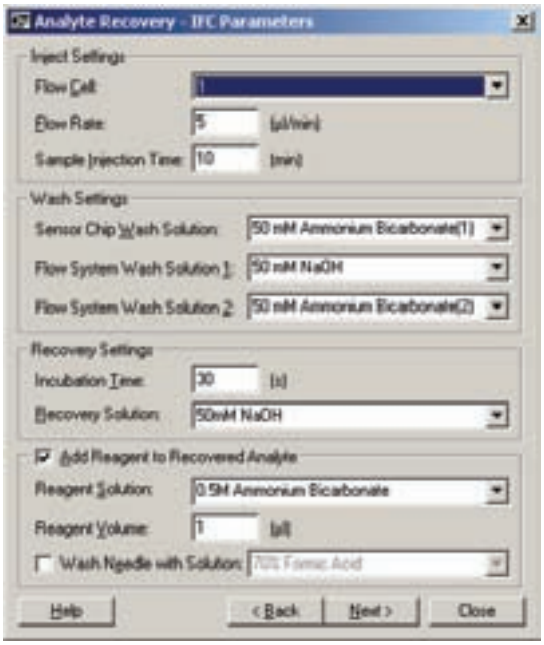
Analyte Recovery を選択し、**Start...**をクリックする。

↓



回収経路として IFC、回収先としてバイアルもしくは MALDI ターゲットを選択する。
MALDI ターゲットを使用する場合は、同時に質量分析計のメーカーとプレートタイプを選択する。（使用可能な MALDI ターゲットについては、補足 48 参照。）
Next>をクリックする。

↓



Injection Settings

Flow Cell	回収に用いるフローセル
Flow Rate	流速
Sample Injection Time	アナライト添加時間

Wash Settings

Sensor Chip Wash Solution	センサーチップ表面洗浄溶液
Flow System Wash Solution1	流路洗浄溶液 1*
Flow System Wash Solution2	流路洗浄溶液 2*
	＊センサーチップ表面へは流れない

Recovery Settings

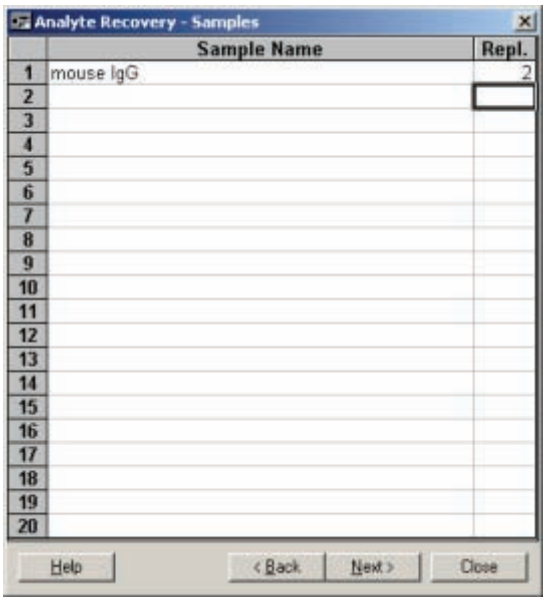
Incubation Time	回収溶液の接触時間
Recovery Solution	回収溶液

Add Reagent Recovered Analyte

Reagent Solution	添加溶液
Reagent Volume	添加溶液量（1～10 µl）
Wash Needle with Solution	ニードルの洗浄
	＊ **Add Reagent Recovered Analyte** は、回収先に中和溶液や質量分析計に持ち込む場合のマトリックスを添加したい場合にチェックを入れる。

Next >をクリックする。

↓

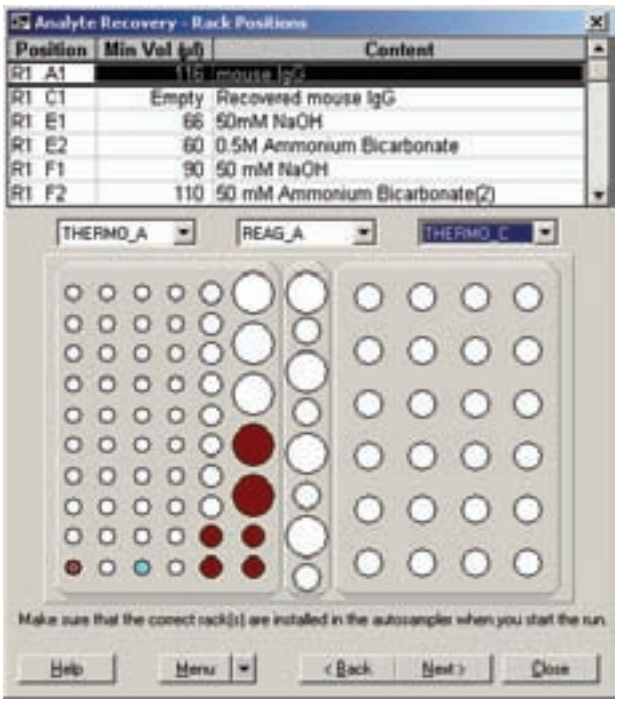


Sample Name アナライト名

Repl. 回収操作の繰り返し回数

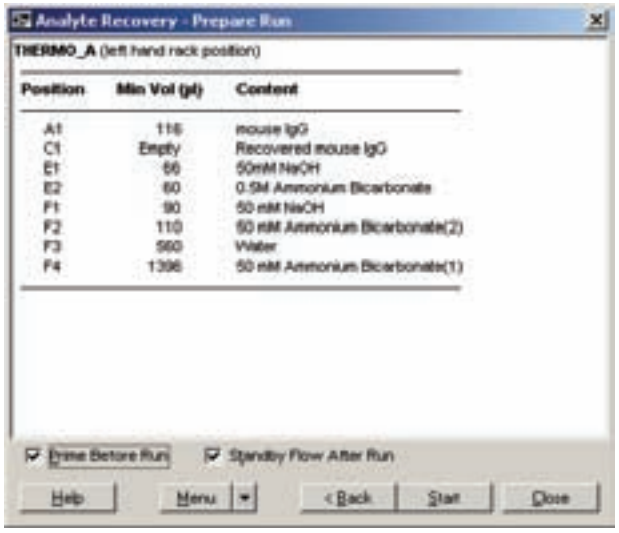
Next >をクリックする。

↓



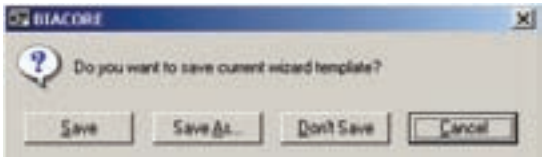
必要量調製した各バイアルと回収先の空バイアルをセット後、**Next >**をクリックする。

↓



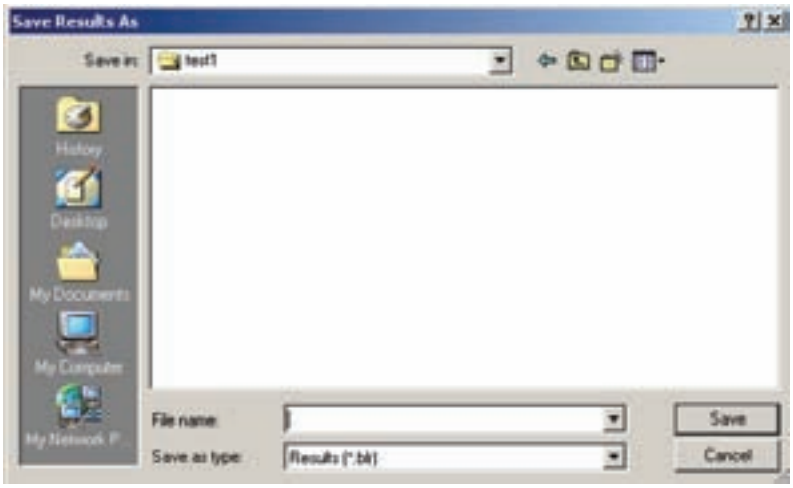
溶液の位置と容量を再確認し、**Standby Flow After Run** にチェックを入れる。必要があれば **Prime Before Run** にもチェックを入れる。**Start** をクリックする。

↓



作成したウィザードプログラムをテンプレートとして保存するかどうか、メッセージが表示される。通常 **Don't Save** をクリックする。(結果ファイルに保存される。補足 11 参照。)

↓



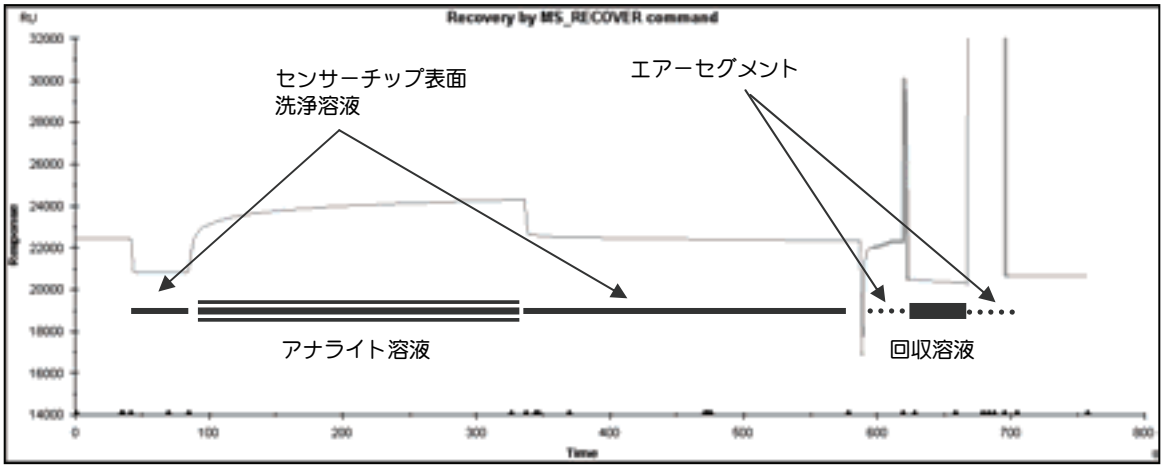
保存先のフォルダを選択し、ファイル名を入力する。
Save をクリックする。

↓

操作が開始する。
緊急停止したい場合は、キーボードの **Ctrl（左下）＋ Break（右上）**を同時に押す。

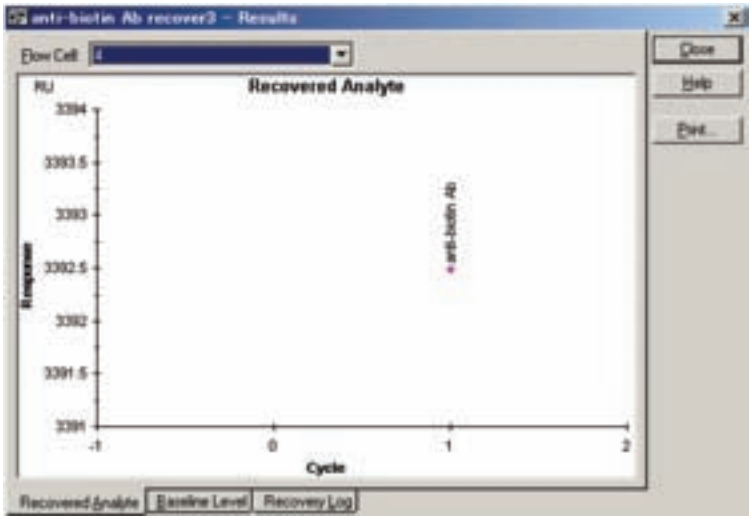
↓

センサーグラムとログが表示される。



設定回数分の回収が完了すると、結果画面が表示される。

↓



Flow Cell 結果を表示したいフローセルを選択。

Recovered Analyte 縦軸はレスポンス（RU）、横軸はサイクル番号で、回収後のレスポンスがプロットされる。

結果の評価

フローセルの面積は約 1.2 mm^2 であり、1000RU の変化量は、約 1 ng/mm^2 に相当する。回収後のレスポンスから、何 ng 分回収できたかを計算することによって、どれくらいの濃度で何回回収すれば、目的の量に到達するかを計算する。また、サイクルごとのレスポンスをプロットしているので、変動幅から、リガンドの失活などを確認できる。

↓

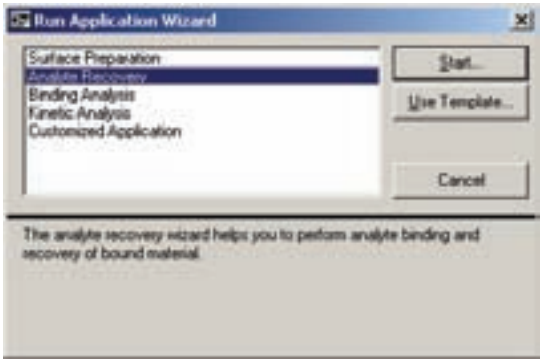
装置は **Standby** 状態になっている。**Tools** → **Stop Standby** で終了する。

9-5-2. Surface Prep ユニットを用いた回収

マイクロ流路系を使用して決定した回収条件を用いて、Surface Prep ユニットで回収操作をおこなう。
フローセルキャリアのタイプ 2 を使用して、新しいセンサーチップへリガンドを固定化したあと、回収操作を実行する。

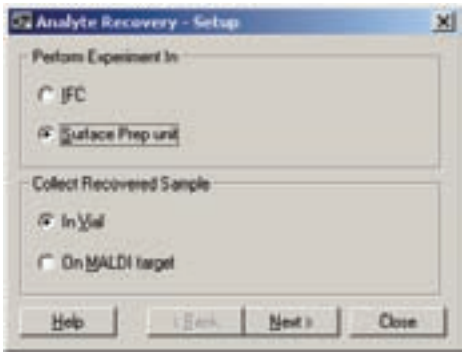
Run → Run Application Wizard...をクリックする。

↓



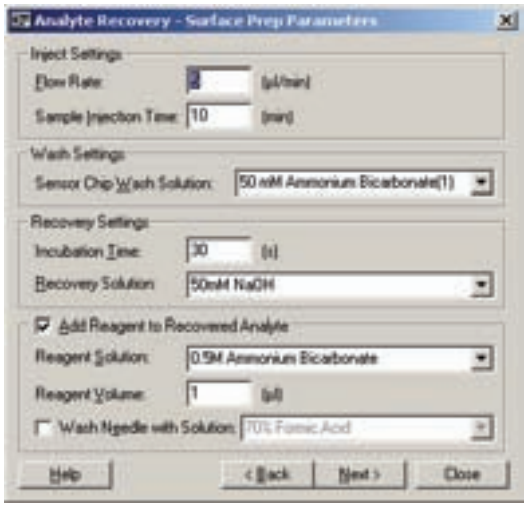
Analyte Recovery を選択し、**Start...**をクリックする。

↓



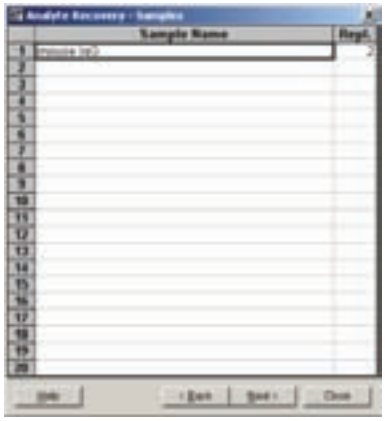
回収経路として **Surface Prep unit**、回収先としてバイアル (In Vial)もしくは MALDI ターゲット(On MALDI target)を選択する。MALDI ターゲットを使用する場合は、同時に質量分析計のメーカーとプレートタイプを選択する。(使用可能な MALDI ターゲットについては、補足 48 参照。)
Next >をクリックする。

↓



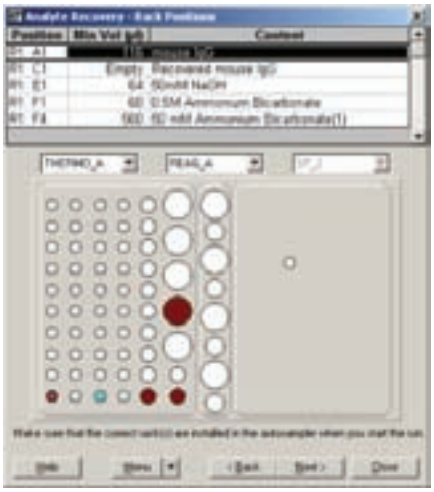
回収条件を入力する。(回収操作の設定については 116 ページを参照。)
Next >をクリックする。

↓



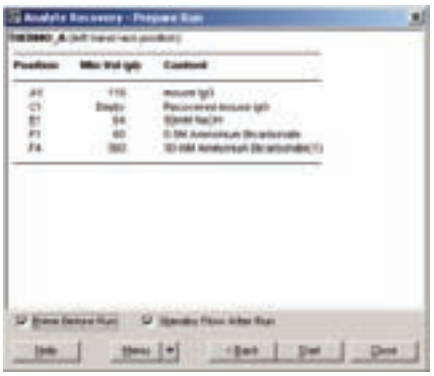
Sample Name アナライト名
Repl. 回収操作の繰り返し回数
Next >をクリックする。

↓



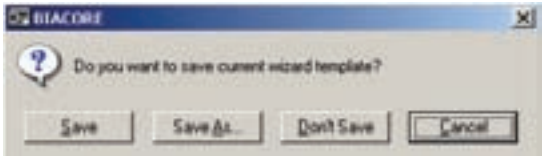
必要量調製した各バイアルと回収先の空バイアルをセット後、**Next >**をクリックする。

↓



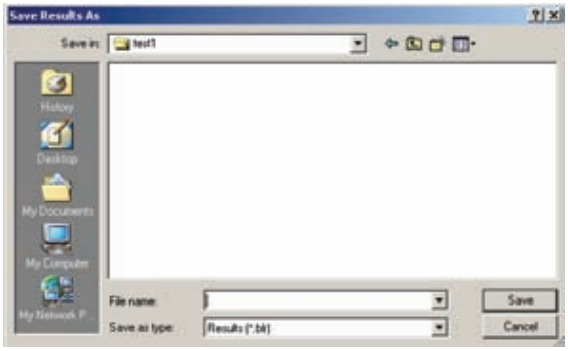
溶液の位置と容量を再確認し、**Standby Flow After Run** にチェックを入れる。必要があれば **Prime Before Run** にもチェックを入れる。**Start** をクリックする。

↓



作成したウィザードプログラムをテンプレートとして保存するかどうか、メッセージが表示される。通常 **Don't Save** をクリックする。（結果ファイルに保存される。補足 11 参照。）

↓

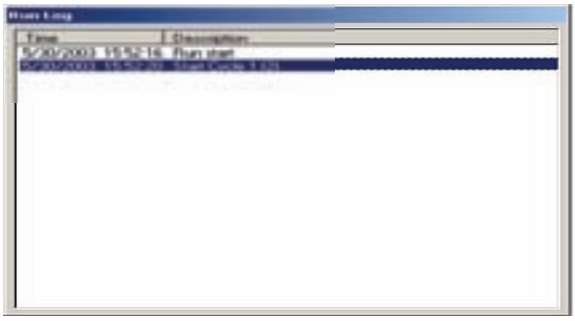


保存先を指定して、ファイル名を入力する。**Save** をクリックする。

↓

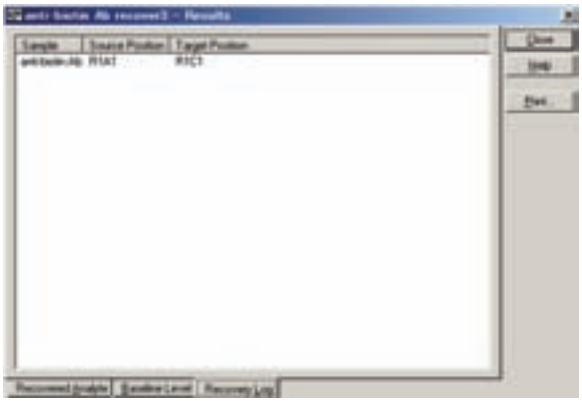
操作が開始する。

緊急停止したい場合は、キーボードの **Ctrl（左下）＋ Break（右上）**を同時に押す。



回収作業中は Run Log 画面が表示される。（センサーグラムは表示されない。）

↓



終了後は結果画面が表示される。**Close** をクリックしてウィザードを終了する。

↓

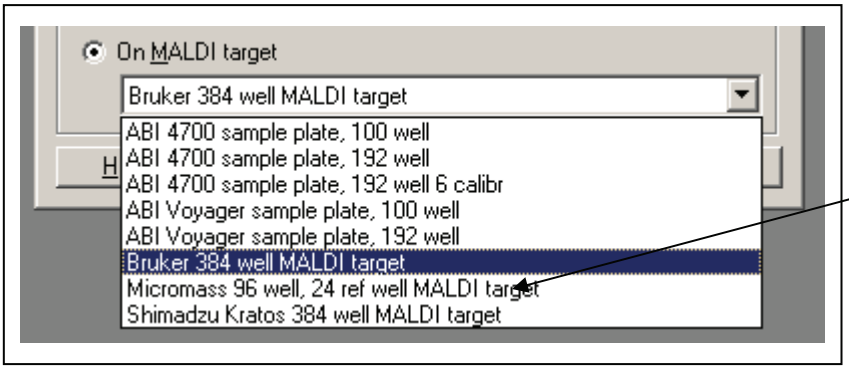
システム本体は **Standby** 状態である。**Tools → Stop Standby** で終了する。

補足 48. 使用可能な MALDI ターゲット

MALDI ターゲットは MALDI Holder にセットして使用する。

標準 MALDI Holder　　修飾 MALDI Holder（別売）　　MALDI Holder アダプター（別売）

標準 MALDI Holder で使用できる MALDI ターゲットは以下の通りである。


On MALDI target
Bruker 384 well MALDI target
ABI 4700 sample plate, 100 well
ABI 4700 sample plate, 192 well
ABI 4700 sample plate, 192 well 6 calibr
ABI Voyager sample plate, 100 well
ABI Voyager sample plate, 192 well
Bruker 384 well MALDI target
Micromass 96 well, 24 ref well MALDI target
Shimadzu Kratos 384 well MALDI target

このターゲットのみ標準MALDI Hoder とMALDI Hoder アダプターを組み合わせる必要がある。

修飾 MALDI Holder（別売）で使用できる MALDI ターゲットは以下の通りである。

Waters Micromass 12well, 2ref strip for Q-TOF Ultima Global

PerkinElmer MDS Sciex MALDIchip target, 96 well

PerkinElmer MDS Sciex MALDIchip target , 384 well

9-6. Surface Prep ユニットの洗浄

Surface Prep Wash　使用後に必ず実施

準備するもの

	低分子化合物使用後の洗浄	タンパク質使用後の洗浄
溶液 1	50% Isopropanol/ 10% formic acid	BIAdesorb solution 1*
溶液 2	50% DMSO	BIAdesorb solution 2
ランニング 緩衝液	超純水	超純水

＊質量分析は SDS の混入に影響を受けやすいため、BIAdesorb solution 1 を使用してクリーニングをおこなったあとは、溶液 1、2 に超純水を用いて数回 **Surface Prep Wash** を実行する。

ラックベース 1（左側）	Thermo A
ラックベース 2（右側）	Surface Prep ユニット
R1F3	溶液 1
R1F4	溶液 2

（所要時間はタイプ 1 で約 20 分間、タイプ 2 で約 10 分間）

補足 49. メンテナンスおよびユニット保管の注意事項

① Surface Prep ユニットに、リガンドが固定化されているセンサーチップをセットしたまま洗浄すると、リガンドが失活するので、必ず洗浄用のセンサーチップと入れ替えておこなう。
② システム本体は、洗浄用のセンサーチップを **Dock** し、超純水で **Prime** を実行してから、**Surface Prep Wash** を実行する。
③ フローセルキャリアを取り外し、超純水で洗浄する。インジェクションブロック、アルミプレート部分は超純水またはエタノールで洗浄する。
④ フローセルキャリア、インジェクションブロック、Surface Prep ユニットは、埃などの付着を避けるため、ビニール袋などに入れて保管する。

索引

[あ]
アナライトの調製・・・

センサーチップの保存・・95

相互作用測定条件の検討 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・37
装置の配置 ・・・1

[た]
チオールカップリング・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 17,84

低分子物質の固定化 ・・20
データの管理・・101
添加の中止・・・46
電源の立ち上げ ・・1

[な]
濃度測定・・52,64,89

[は]
ファイルの保存・・・15

プライム・・ 5,6,94,96,97
フラッシュ・・96
ペプチドの固定化・・20

[ま]
メンテナンス・・・96

[ら]
ラックベース・・・7,8

リガンド希釈液 ・・19,21
リガンドチオールカップリング・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・17,84
リガンドの固定化・・17
リファレンスライン・・14,15,44
リンス・・96

レポートポイントの記録・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・14

流路の選択・・40
流路系に詰まりがあるとき・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・98

INDEX

[A]
Aim for immobilization level • 28

[B]
BIGINJECT • 42
Binding Analysis • 64,69

[C]
Close • 94
CM5 • 4,17,21
COINJECT • 42
Command Queue • 45
Customized Application • 64,74,76,89

[D]
Desorb • 96
Dock • 3

[E]
Extra Cleanup • 46

[F]
FLUSH • 96

[H]
HPA • 4,84

[I]
If/Then • 85,88
Immobilization • 17
Immobilization pH scouting • 21
INJECT • 11,42

[K]
Kinetics analysis • 64
KINJECT • 42

[L]
Linked Reaction • 60
L1 • 4,84

[M]
Mass Transfer • 18,56

[N]
Normalize • 10
NTA • 4,84

[P]
Prime • 5,6,94,96,97

[Q]
QUICKINJECT • 42

[R]
Regeneration Scouting • 47
Rinse • 96

[S]
SA • 4,84
Sanitize • 97
Specify Flow Rate and Injection Time • 28

[U]
Unclogging • 97
Undock • 95

[W]
Wizard Template • 84

安全上のご注意

必ずお守りください

このしおりには、弊社機器に関する一般的な注意事項を記載しています。取扱いの詳細は必ず製品添付の使用説明書をご覧ください。

誤った取扱いをした場合に生じる危険や損害の程度を、次の区分で説明しています。

警告 誤った取扱いをした場合に、死亡や重傷を負う可能性があるもの。

注意 誤った取扱いをした場合に、傷害または物的損害が発生する可能性があるもの。

図記号の意味は次の通りです。

禁 止 ⃠は、してはいけない「禁止」を示します。

❗は、必ず実行していただく「強制」を示します。

警告

禁 止

電源プラグの抜き差しにより、運転を停止しない

火災・感電の原因になります。

禁 止

電源コードを途中で接続しない、タコ足配線をしない

火災・感電・故障の原因になります。

禁 止

電源コード・電源プラグを傷つけない

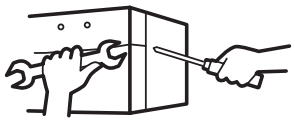
●加工しない ●束ねない ●ねじらない
●折らない ●物をのせない ●加熱しない
●無理に曲げない

破損して火災・感電の原因になります。

禁 止

修理・分解・改造はしない

火災・感電の原因になります。



根元まで差込む

電源プラグのほこりを取り除き、刃の根元まで確実に差込む

接続が不十分だと、隙間にほこりが付着して火災・感電の原因になります。

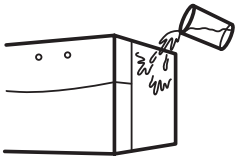
指定の規格

取扱説明書に指定された規格のコンセントを使用する

指定された規格以外で使用すると火災・感電の原因になります。

禁 止

本体を水につけたり、水をかけたりしない



ショート・感電の原因になります。

禁 止

電源コードや電源プラグが傷んだり、コンセントの差し込みがゆるいときは使わない

感電・ショート・発火の原因になります。

禁 止

使用時や使用直後（運転停止後約60分間）は、操作に関係のない部位には触れない

高温部に触れ、やけどの原因になります。

プラグを抜く

異常時は、運転を停止して電源プラグを抜く

異常のまま運転を続けると火災・感電の原因になります。

禁 止

同梱の電源コード・電源プラグ以外のコード・プラグを使用しない

故障・火災・感電の原因になります。

禁 止

同梱の電源コード・電源プラグを他の電気機器に使用しない

故障・火災・感電の原因になります。

⚠ 注意

禁 止

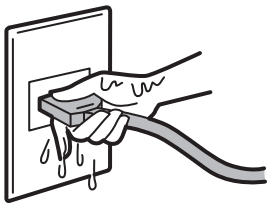
設置時は、次のような場所には置かない

●不安定な場所　●湿気やほこりの多い場所
●油煙や湯気が当たる場所
●直射日光の当たる場所　●風雨のあたる場所
●熱器具の近く　●高温になる場所
●吸・排気口をふさぐような場所

このような場所に置くと、ショートや発熱、電源コードの被膜が溶けるなどして、火災や感電、故障、変形の原因になることがあります。

禁 止

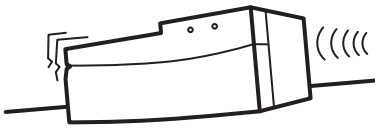
ぬれた手で電源プラグを抜き差しをしない



感電の原因になります。

水平

水平で丈夫な場所に設置する



プラグを持つ

電源プラグを持ってまっすぐ引き抜く

ななめに引き抜いたり、コードを持って抜くと、プラグの刃や芯線が破損してショート・感電・発火の原因になります。

⚠ 低温室で使用する場合の注意

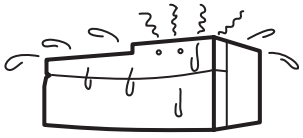
電源を
入れておく

装置を低温環境下でご使用になる場合、システム電源は常時入れておく

低温環境下で長時間システムの電源を落とした状態で放置すると、結露などにより故障の原因になります。
ランプなどの消耗品は OFF にしておくと、劣化を防ぐことができます。

電源を
入れない

装置を低温室から常温の場所に移動させる場合、常温に設置後、装置内の結露が無くなるまでシステム電源を入れない（状況により異なるが、通常半日から一昼夜）



感電・漏電火災の原因になります。

弊社製品についてのお問合せ　（バイオダイレクトライン）

TEL：03-5331-9336

受付時間 9：00 ～ 17：30
土・日・祝日、弊社指定休業日、年末年始を除く

■機器メンテナンス・保守契約・修理のお問合せ

● 東日本技術サービス部

TEL：03-5331-9315
FAX：03-5331-9349

● 西日本技術サービス部

TEL：06-6305-4707
FAX：06-6305-3599

■テクニカルのお問合せ（バイオダイレクトライン）

● TEL：03-5331-9336

応答メッセージが聞こえましたら、下記の番号を押してください。

❶ クロマトグラフィー関連製品　：
❷ ビアコア関連製品　：　← Biacore 3000 はこちら
❸ イメージャー・電気泳動関連製品　：
❹ その他製品　：

● FAX：03-5331-9370

● e-mail：Tech-JP@ge.com

※ アナログ回線等で番号選択ができない場合はそのままお待ちください。
オペレーターにつながります。

©2010 GE ヘルスケア・ジャパン株式会社　本書の全部または一部を無断で複写複製することは、著作権法上の例外を除き、禁じられています。
掲載されている製品は試験研究用以外には使用しないでください。掲載されている内容は予告なく変更される場合がありますのであらかじめご了承ください。
掲載されている社名や製品名は、各社の商標または登録商標です。

GEヘルスケア・ジャパン株式会社
ライフサイエンス統括本部
〒169-0073
東京都新宿区百人町 3-25-1 サンケンビルヂング
お問合せ：バイオダイレクトライン
TEL : 03-5331-9336　FAX : 03-5331-9370
e-mail : Tech-JP@ge.com

ISO 9001:2000認証取得

取扱店